

Universidade Nova de Lisboa
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Departamento de Química

Permeabilidade do tecido adiposo à água e ao glicerol: efeito do ácido linoleico conjugado (CLA)

Por

Ana Paula Cavaco da Silva Martins

Dissertação apresentada na Faculdade de ciências e Tecnologia da Universidade nova de Lisboa para obtenção do grau de mestre em Biotecnologia

Orientação:

Professora Doutora Graça Soveral: Faculdade de Farmácia de Lisboa, Universidade de Lisboa; REQUIMTE – CQFB

Professora Doutora Teresa Moura: FCT/UNL ; REQUIMTE-CQFB

Monte da Caparica, Almada
2009

Aos meus pais, avó e filho.

RESUMO / ABSTRACT

Este trabalho teve como objectivo estudar a influência do ácido linoleico conjugado (CLA) suplementado numa alimentação rica em gorduras saturadas provenientes de uma fonte vegetal (óleo de palma) e gorduras insaturadas provenientes de uma fonte animal (gordura de ovino), no transporte membranar de água e de glicerol do tecido adiposo de ratos obesos (Zucker).

A permeabilidade membranar das vesículas obtidas a partir do tecido adiposo foi estudada através da técnica do fluxo interrompido usando a luz dispersa para seguir as alterações do volume vesicular causadas pelo efluxo de água e pelo influxo de glicerol, determinando-se os respectivos coeficientes de permeabilidade e energias de activação. Paralelamente, determinou-se a incorporação dos ácidos gordos alimentares nas membranas por cromatografia gasosa.

Concluiu-se que a suplementação em CLA da dieta não provocou alterações na permeabilidade à água e ao glicerol. No entanto, verificou-se que quando a gordura presente na alimentação é gordura de ovino, o coeficiente de permeabilidade para a água é maior relativamente ao observado quando a gordura é o óleo de palma. Verificou-se ainda que a composição lipídica membranar se correlaciona com a ingestão das diferentes gorduras. Estes resultados indicam uma provável alteração da fluidez membranar devido à ingestão das diferentes gorduras.

The aim of this work was to study the influence of conjugated linoleic acid (CLA) in diets either rich in saturated fats from a vegetal source (palm oil) or rich in unsaturated fats from an animal source (ovine fat), in the transport of water and glycerol through the membrane of adipose tissue from obese rats (Zucker).

The membrane permeability of vesicles obtained from adipose tissue was studied by the stopped flow light scattering technique in order to follow vesicular volume alterations caused by water efflux and glycerol influx. The respective permeability coefficients and activation energies were calculated. The incorporation of the dietary fatty acids in the membranes was also determined by gas chromatography.

We found that the supplementation of the two diets with CLA did not affect the water and glycerol permeability. However, in ovine fat rich diets the water permeability coefficient was higher than the observed in palm oil rich diets. It was also found that the membrane lipid composition correlates with the ingestion of the different dietary fats. These results indicate a probable alteration of the membrane fluidity due to the ingestion of the different dietary fats.

LISTA DE ABREVIATURAS

Simbologia e notações

LA	Ácido Linoleico
CLA	Ácido Linoleico Conjugado
t	Configuração <i>trans</i>
c	Configuração <i>cis</i>
FAME	Esteres metílicos de ácidos gordos (fatty acid methyl éster)
SFA	Ácidos gordos saturados
MUFA	Ácidos gordos mono-insaturados
PUFA	Ácidos gordos poli-insaturados
LCPUFA	Ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa
SFA	Ácidos gordos saturados
DHA	Ácido docosahexanóico
P_f	Coefficiente de permeabilidade osmótica
P_{gly}	Coefficiente de permeabilidade para o glicerol
P_s	Coefficiente de permeabilidade para o soluto
P_d	Coefficiente de permeabilidade para difusional
P_f	Coefficiente de permeabilidade de filtração
P_{osm}	Coefficiente de permeabilidade osmótico
E_a	Energia de activação
$E_{a_{água}}$	Energia de activação para a permeação da água
$E_{a_{gly}}$	Energia de activação para a permeação do glicerol
Π	Pressão osmótica
P	Pressão hidrostática
R	Constante dos gases perfeitos
T	Temperatura
V_w	Volume molar da água
V	Volume
J	Fluxo
C	Concentração
A	Área
SD	Desvio Padrão
AQP	Aquaporina
GlpF	<i>Escherichia coli</i> Glycerol Facilitator
MIP	Proteínas Intrínsecas de Membrana
(NPA)	Sequência Asn-Pro-Ala no poro das aquaporinas
(PCMBs)	Ácido p-cloromercurifenilsulfónico
CCB	Coomassie Brilliant Blue
μ_s	Potencial químico da substância s

ÍNDICE

RESUMO / ABSTRACT	3
LISTA DE ABREVIATURAS	5
ÍNDICE	6
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
ÍNDICE DE TABELAS.....	9
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	10
CAPÍTULO I INTRODUÇÃO.....	11
1. ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO	12
2. ALTERAÇÕES NA MEMBRANA CELULAR EM RESPOSTA A MANIPULAÇÕES NUTRICIONAIS.....	14
2.1. Estrutura e Organização da Membrana	14
2.2. Fluidez	15
2.3. Permeabilidade	15
3. TRANSPORTE DE ÁGUA ATRAVÉS DE MEMBRANAS	16
3.1. Permeação através da Camada Bilipídica	16
3.2. Permeação através de Canais.....	17
3.3. Gradientes responsáveis pelo transporte de água	18
3.4. O coeficiente de permeabilidade osmótica	20
3.5. Energia de activação de Arrhenius	21
4. TRANSPORTE DE SOLUTO ATRAVÉS DE MEMBRANAS	22
4.1. Gradiente responsável pelo transporte de glicerol	22
4.2. Coeficiente de Permeabilidade ao Glicerol	23
4.3. Energia de activação de Arrhenius	23
5. CANAIS DE ÁGUA: AQUAPORINAS	24
5.1. Selectividade das AQP's	24
5.2. Aquaporinas ortodoxas: a AQP1	26
5.2.1. Estrutura da AQP1	26
5.2.2. Mecanismo de permeação da água na AQP1.....	28
5.3. Aquagliceroporinas.....	29
5.3.1. Estrutura da GlpF	29
5.3.2. Selectividade da GlpF	30
5.4. Inibição das AQP's pelo Mercúrio	31
6. TECIDO ADIPOSEO	32
6.1. Adipócitos.....	32
7. OBJECTIVOS	33
CAPÍTULO II MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
1. ANIMAIS E DIETAS	36
1.1. Animais.....	36
1.2. Composição das Dietas	36
2. PREPARAÇÃO DAS VESÍCULAS DE TECIDO ADIPOSEO	37
3. DETERMINAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS.....	38
4. DETERMINAÇÃO DAS OSMOLARIDADES DAS SOLUÇÕES	39
5. DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO DAS VESÍCULAS.....	39
6. TÉCNICA INTERRUPTÃO BRUSCA DE FLUXO	40
6.1. Transporte de água	43
6.2. Transporte de Glicerol.....	43
7. DETERMINAÇÃO DOS COEFICIENTES DE PERMEABILIDADE A PARTIR DOS DADOS EXPERIMENTAIS.....	44
7.1. Coeficiente de Permeabilidade Osmótica (P_i).....	44
7.1.1. A taxa de entrada de água (dV/dt) é proporcional à pressão osmótica criada pelo gradiente de concentração do soluto.....	45
7.1.2. P_i pode ser calculado a partir dos parâmetros de ajuste do sinal a funções exponenciais.....	45
7.1.3. Relação entre o volume vesicular e o sinal de luz dispersa.....	46

7.2.	<i>Coeficiente de Permeabilidade ao Glicerol (P_{Gly})</i>	48
7.2.1.	P_{Gly} pode ser calculado a partir dos parâmetros de ajuste do sinal a funções exponenciais.....	48
8.	DETERMINAÇÃO DAS ENERGIAS DE ACTIVAÇÃO	48
9.	CROMATOGRAFIA GASOSA.....	49
CAPÍTULO III RESULTADOS E DISCUSSÃO		51
1.	CARACTERIZAÇÃO DAS VESÍCULAS DE TECIDO ADIPOSEO	52
1.1.	<i>Determinação das proteínas totais</i>	53
2.	TAMANHO DAS VESÍCULAS	53
3.	ESTUDO DA PERMEABILIDADE MEMBRANAR	54
3.1.	<i>Permeabilidade à água e ao glicerol</i>	54
3.2.	<i>Efeito do $HgCl_2$ nas permeabilidades</i>	57
4.	CONSTITUIÇÃO EM ÁCIDOS GORDOS DAS DIETAS E SUA INCORPORAÇÃO NAS MEMBRANAS	59
4.1.	<i>Composição e perfil de ácidos gordos das dietas</i>	59
4.2.	<i>Composição e perfil de ácidos gordos nas preparações de vesículas</i>	60
CAPÍTULO IV CONCLUSÕES		63
CAPÍTULO V BIBLIOGRAFIA		65
ANEXOS		71
ANEXO I - POTENCIAL QUÍMICO E EQUILÍBRIO OSMÓTICO.....		72
1.	ENERGIA DE GIBBS	72
1.1.	<i>Energia livre de Gibbs</i>	72
2.	POTENCIAL QUÍMICO E ELECTROQUÍMICO	72
2.1.	<i>Potencial Químico</i>	72
2.2.	<i>Potencial Electroquímico</i>	73
2.3.	<i>Forma explícita do potencial electroquímico</i>	73
3.	POTENCIAL QUÍMICO DA ÁGUA	74
4.	EQUILÍBRIO OSMÓTICO E LEI DE VAN'T HOFF	75
4.1.	<i>Equilíbrio osmótico em células animais</i>	75
5.	LEI DE FICK	76
ANEXO II – OSMOMETRIA E TONICIDADE.....		77
1.	OSMOLARIDADE, OSMOLALIDADE E CONCENTRAÇÃO	77
2.	O OSMÓMETRO	78
3.	TONICIDADE	80
ANEXO III - DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DAS VESÍCULAS POR DISPERSÃO DINÂMICA DA LUZ (QUASI ELASTIC LIGHT SCATERING QELS)		82
1.	FLUTUAÇÕES NA INTENSIDADE DA LUZ DISPERSA	82
2.	INTERPRETAÇÃO DAS FLUTUAÇÕES NA INTENSIDADE DA LUZ DISPERSA	83
1.1.	<i>Sistemas Polidispersos</i>	84
3.	APRESENTAÇÃO DAS DISTRIBUIÇÕES DE TAMANHOS POR NÚMERO, VOLUME E INTENSIDADE	85
4.	APARELHO	86
ANEXO IV - DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS		88
1.	MÉTODO DE BRADFORD	88
1.1.	<i>Fundamento</i>	88
1.2.	<i>Recta de Calibração para a determinação de proteínas totais</i>	89
1.2.1.	<i>Cálculos</i>	90
ANEXO V - RESUMO DOS RESULTADOS.....		91

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura I-1– Estrutura do ácido linoleico conjugado e dos isómeros cis-9,trans-11CLA e trans-10,cis-12CLA</i>	13
<i>Figura I-2 – Modelo proposto para o modo de acção do DHA</i>	15
<i>Figura I-3– Permeação através de uma membrana homogénea</i>	17
<i>Figura I-4– Permeação de uma membrana pela água através de um canal</i>	18
<i>Figura I-5– Três formas de medir o fluxo de água através de uma membrana</i>	19
<i>Figura I-6 – Energia de activação para a permeação através dos lípidos da membrana ou através de canais</i>	22
<i>Figura I-7 – Fluxo de glicerol através de uma membrana</i>	23
<i>Figura I-8 – Aquaporinas de mamíferos e de E. coli</i>	25
<i>Figura I-9 – Vista de topo e vista lateral do tetrâmero da AQP1</i>	26
<i>Figura I-10 – Organização estrutural dos monómeros de AQP1</i>	27
<i>Figura I-11 – Organização estrutural do tetrâmero da AQP1</i>	27
<i>Figura I-12 – Representação esquemática do mecanismo de bloqueio á passagem do protão</i>	28
<i>Figura I-13 – Representação esquemática da GlpF</i>	30
<i>Figura I-14 – Vista lateral da superfície interna do canal na GlpF e na AQP1</i>	30
<i>Figura I-15 – Adipócitos isolados</i>	32
<i>Figura I-16 – Pormenor da membrana plasmática dos adipócitos: Claveolae</i>	33
<i>Figura II-1 – Esquema de preparação de vesículas de tecido adiposo</i>	38
<i>Figura II-2 – Esquema de um espectrofotómetro de fluxo interrompido</i>	41
<i>Figura III-1 – Observação ao microscópio de um corte de tecido adiposo</i>	52
<i>Figura A 1 – Depressão crioscópica</i>	78
<i>Figura A 2 – Temperatura vs tempo para a água pura e água com um soluto em solução</i>	79
<i>Figura A 3 – Relação entre as osmolaridades das soluções nos vários compartimentos do aparelho de Stop-Flow</i>	81
<i>Figura A 4 – Esquema da luz dispersa recolhida pelo detector</i>	82
<i>Figura A 5 – Intensidade da luz dispersa e respectiva função de correlação</i>	83
<i>Figura A 6 – Distribuição de tamanhos por intensidade</i>	85
<i>Figura A 7 – Diferença entre distribuições por número, volume e intensidade</i>	86
<i>Figura A 8 – Esquema de um aparelho de QELS</i>	87
<i>Figura A 9 – Espectro do CBB Ligado (linha vermelha) e não Ligado (linha azul) a Proteínas</i>	88
<i>Figura A 10 – Representação Esquemática da Reacção de Ligação do CBB a Proteínas</i>	89

ÍNDICE DE TABELAS

<i>Tabela II-1– Composição das dietas</i>	<i>37</i>
<i>Tabela III-1– Resumo dos resultados obtidos para P_f, P_{gly}, $Ea_{(água)}$ e $Ea_{(glicerol)}$</i>	<i>56</i>
<i>Tabela III-2– Resumo dos resultados obtidos para P_f e P_{gly} com e sem inibição pelo $HgCl_2$</i>	<i>58</i>
<i>Tabela III-3– Perfil de ácidos gordos nas dietas.....</i>	<i>59</i>
<i>Tabela III-4– Conteúdo em colesterol (mg/g vesículas) e ácidos gordos (% total de FAME) das membranas.....</i>	<i>62</i>
<i>Tabela A 1 – Preparação de Padrões da recta de Calibração com Albumina</i>	<i>89</i>
<i>Tabela A 2 – Resumo dos resultados (Proteínas Totais e Rendimentos).....</i>	<i>91</i>
<i>Tabela A 3 – Resumo dos resultados (Diâmetros e Permeabilidade).....</i>	<i>92</i>

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico II-1 – Sinais de variação de luz dispersa obtidos pela técnica de interrupção brusca de fluxo	42
Gráfico II-2 – Sinal de variação da luz dispersa obtido por interrupção brusca de fluxo num choque hiperosmótico com glicerol	43
Gráfico II-3 – Sinal de fluxo interrompido devido a um choque hiperosmótico.....	47
Gráfico II-4 – ΔI em função de Δ	48
Gráfico III-1 – Diâmetro das vesículas medido por QELS.....	53
Gráfico III-2 – Sinal de fluxo interrompido devido a um choque osmótico de tonicidade 2 e do correspondente ajuste a uma exponencial simples ($T=23^{\circ}\text{C}$)	54
Gráfico III-3 – Sinal de fluxo interrompido devido a um choque de glicerol com gradiente 60 mosM e do correspondente ajuste a uma exponencial simples ($T=23^{\circ}\text{C}$)	55
Gráfico III-4 – Representação gráfica de Arrhenius para um dos ensaios de permeabilidade à água e respectiva equação.....	55
Gráfico III-5 – Permeabilidade (P_f e P_{gly}) na Presença de HgCl_2	58
Gráfico A1 – Recta de Calibração para Determinação das Proteína Totais	90
Gráfico A2– Resumo dos resultados obtidos para P_f , P_{gly} , $Ea_{(água)}$ e $Ea_{(glicerol)}$	93

Capítulo I

INTRODUÇÃO

1. ÁCIDO LINOLEICO CONJUGADO

Os ácidos Linoleicos conjugados, (CLAs) são um grupo de ácidos octadecadienoicos (18:2) que se encontram naturalmente presentes em produtos alimentares, nomeadamente nas carnes de bovino e ovino. Estas carnes, devido à fracção lipídica que as caracteriza, têm sido consideradas alimentos pouco saudáveis. Com efeito, no rumen os alimentos tendem a ser hidrogenados devido à acção dos microrganismos ruminais, o que conduz à formação de ácidos gordos saturados (SFA) e de ácidos gordos trans-monoin saturados (trans-MUFA). No entanto, alguns estudos indicam que não são estas carnes em si mesmas que constituem um factor de risco para as doenças características do estilo de vida ocidental, mas sim o teor excessivo e o tipo de gordura que elas geralmente apresentam [1].

Para além disso, um ácido gordo com propriedades funcionais, o CLA, foi isolado pela primeira vez da carne de bovino. Embora seja um ácido gordo com origem na carne de ruminantes e em produtos lácteos, o CLA tem sido associado a inúmeros benefícios na saúde, razão pelo que tem atraído muita atenção na comunidade científica.

CLA é a designação dada a múltiplos isómeros geométricos do ácido linoleico (LA) (C18:Cn-6) com ligações duplas conjugadas [1]. Estas ligações duplas, tanto na configuração *trans* (t) ou *cis* (c), estão presentes predominantemente nas posições 6,8 a 12,14.

Encontram-se descritos vinte isómeros do CLA como constituintes naturais dos alimentos [2]. O isómero de CLA mais abundante na carne de bovino e ovino assim como em produtos lácteos é o cis-9,trans11 (c9,t11) produzido no rumen por biohidrogenação dos ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa (LCPUFAs) alimentares C18 e nos tecidos por dessaturação do C18:1t11. No entanto, os suplementos alimentares que se encontram no mercado possuem uma mistura dos isómeros c9,t11 e t10,c12 em quantidades iguais. Estas formulações comerciais de CLA produzidas industrialmente têm atraído o interesse dos consumidores devido ao seu proposto efeito na diminuição da massa gorda em conjunto com a percepção de que é um composto natural [3] [4].

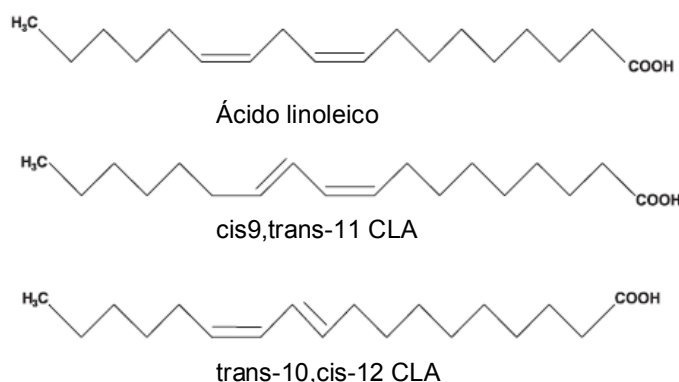


Figura I-1– Estrutura do ácido linoleico conjugado e dos isómeros cis-9,trans-11CLA e trans-10,cis-12CLA [16]

As propriedades funcionais atribuídas ao CLA são muito diversas.

Um grande número de estudos em animais de laboratório, assim como em humanos e culturas de células, sugerem que os isómeros c9,t11 e t10,c12 podem evitar doenças cardiovasculares, diabetes, aterosclerose, modificar funções imunológicas das células e inibir o crescimento de vários tipos de cancro [5] [6]. Adicionalmente surgiram alguns estudos que sugerem que o CLA é também capaz de modificar a composição corporal, parecendo desempenhar um papel importante como agente redutor de peso. De facto, ratinhos alimentados com uma dieta suplementada com 0,5% de CLA reduziram a gordura corporal em 60% e aumentaram a massa corporal magra em 14% relativamente a animais de controlo [1] [5].

Contudo, os esforços para reproduzir estes efeitos em humanos têm produzido resultados inconsistentes [3] [4]. Apesar de terem sido sugeridos vários mecanismos para explicar os efeitos descritos para o CLA à semelhança dos outros LCPUFAs, as vias metabólicas envolvidas são ainda desconhecidas. Alguns mecanismos, tais como alterações na estrutura e composição da membrana, transdução do sinal, expressão de genes e imunidade, têm sido propostos como merecedores de futura investigação [7]. No entanto a questão permanece elusiva: como é que uma simples molécula pode actuar a níveis tão diversos? Postula-se que, pelo menos, uma parte dos benefícios atribuídos ao CLA poderá estar relacionada com algum processo fundamental comum a todo o organismo. Sabendo que a composição lipídica da membrana celular afecta a sua dinâmica e estrutura bem como a actividade das proteínas membranares [8], poder-se-á perguntar se será a incorporação de CLA na membrana um dos processos responsáveis pelos seus benefícios.

Resultados obtidos em estudos anteriores [9] sugerem que a suplementação da mistura de CLA na dieta de ratinhos, em contraste com a suplementação individual dos isómeros isolados, pode aumentar a fluidez da membrana das células renais e consequentemente a sua permeabilidade. No tecido adiposo, os adipócitos são as células responsáveis pelo armazenamento de triglicéridos e acumulação de gordura localizada. Após a hidrólise dos triglicéridos a glicerol e ácidos gordos livres no interior da célula, a permeabilidade membranar poderá ser crucial para a mobilização do glicerol intracelular para o compartimento extracelular, levando a uma diminuição do volume dos adipócitos e facilitando deste modo a redução da gordura corporal.

2. ALTERAÇÕES NA MEMBRANA CELULAR EM RESPOSTA A MANIPULAÇÕES NUTRICIONAIS

Os ácidos gordos presentes na alimentação são incorporados na membrana celular sendo importantes para a sua integridade e função. Desta forma não só a quantidade como também a qualidade dos lípidos presentes na alimentação pode alterar as características e as propriedades das membranas. A actividade das proteínas intrínsecas de membrana (MIP) é muitas vezes afectada pelas estruturas das moléculas de lípidos que as rodeiam [8].

2.1. Estrutura e Organização da Membrana

Os PUFA constituem um grupo influente de moléculas que promovem a saúde por um mecanismo ainda desconhecido. São estruturalmente distinguíveis dos ácidos gordos menos insaturados pela presença de uma unidade $=CH-CH_2-CH_2=$ que se repete e que produz uma cadeia extremamente flexível que se reorienta rapidamente através de estados conformacionais. Um exemplo deste efeito é dado pelo ácido docosahexanóico (DHA) com 6 ligações duplas, referido como o caso de maior insaturação. A elevada desordem introduzida pelo DHA nos fosfolípidos da membrana tem um impacto profundo nesta afectando as suas propriedades e interacção com o colesterol. Resultados obtidos com modelos de membranas demonstram que o DHA e o colesterol têm uma aversão mútua que conduz à segregação de fosfolípidos contendo o DHA em domínios membranares altamente desordenados que se afastam do colesterol. Estes domínios são

organizacionalmente e composicionalmente opostos às jangadas lipídicas (*lipid rafts*), que são domínios ordenados enriquecidos predominantemente em esfingolípidos “colados” pelo colesterol que se acredita servirem de plataforma para a inserção de algumas proteínas. Julga-se que a incorporação do DHA na membrana será pelo menos em parte responsável pelos diversos benefícios associados com o seu consumo [45]. A perda de empacotamento lipídico nestas regiões ricas em DHA favorece a incorporação de algumas proteínas na membrana, podendo mesmo alterar a sua actividade incluindo a sua função no transporte membranar [46].

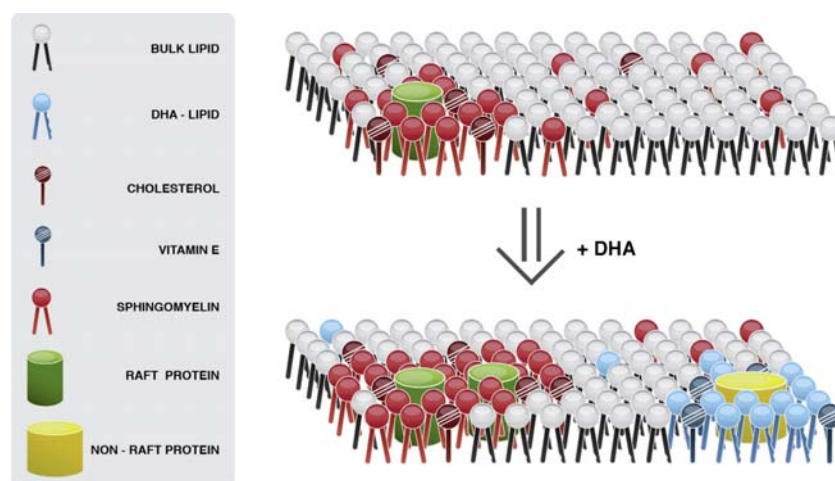


Figura I-2 – Modelo proposto para o modo de acção do DHA [45]

A incorporação de DHA nos fosfolípidos da membrana leva à formação de domínios não-jangada (a azul) dos quais o colesterol é excluído e promove a partição do colesterol e da esfingomielina em jangadas lipídicas (a vermelho) maiores. O domínio rico em DHA, altamente desordenado é o extremo oposto da jangada lipídica, desta forma recruta proteínas que requeiram tal ambiente para funcionarem.

2.2. Fluidez

Foi relatado que o aumento de ligações duplas nos ácidos gordos dos fosfolípidos das membranas de liposomas aumenta a sua fluidez [46]. A incorporação de PUFA na membrana plasmática deverá pois também aumentar a sua fluidez. Este aumento de fluidez já foi por diversas vezes reportado no caso do DHA que apresenta um grau extremo de insaturação [46].

2.3. Permeabilidade

Determinou-se que membranas com maior grau de insaturação mostram também uma permeabilidade aumentada [46]. Existem numerosos estudos

reportando o efeito do DHA no aumento da permeabilidade da membrana a várias moléculas [46], nomeadamente iões, água e solutos. Este efeito foi atribuído a uma perda de empacotamento lipídico resultando numa maior penetração das espécies a permear na bicamada.

3. TRANSPORTE DE ÁGUA ATRAVÉS DE MEMBRANAS

O que dita a passagem da água através da membrana é o seu potencial químico: a água fluirá espontaneamente dos potenciais químicos mais elevados para os mais baixos, de forma a minimizar a variação da energia livre de Gibbs (ANEXO I). Este fluxo de água pode ocorrer através da camada bilipídica ou através de canais de água. No primeiro caso, as moléculas dissolvem-se na membrana, difundem-se através desta e em seguida redissolvem-se do outro lado, movendo-se de forma independente uma vez que a água é pouco solúvel na membrana lipídica. No caso de existirem canais, as moléculas movem-se-ão em coluna, como um todo através do canal interagindo portanto umas com as outras.

3.1. Permeação através da Camada Bilipídica

As moléculas atravessam a bicamada lipídica por difusão. A difusão deve-se ao movimento aleatório individual das moléculas e é descrita pela lei de Fick (ANEXO I). O fluxo é dado pela velocidade global com que as moléculas de soluto passam através da barreira energética que separa dois compartimentos. As partículas de soluto estão embebidas na rede de moléculas de solvente, restringidas por forças atractivas exercidas pelas moléculas de solvente vizinhas. No entanto elas oscilam para trás e para a frente em torno de uma posição média onde a sua energia é mais baixa. Ocasionalmente, adquirem energia suficiente (por exemplo através de interacções térmicas) para se libertarem das moléculas de solvente que as aprisionam, avançando para outra posição na rede. Como ao longo da membrana se estabelece um gradiente de concentração, há mais moléculas a avançarem no sentido descendente do gradiente do que no sentido ascendente, estabelecendo-se desta forma um fluxo através da membrana.

Para as moléculas passarem de um para o outro lado da membrana, têm de ocorrer pelo menos três processos (Figura I-3):

Processo 1 – A molécula tem que passar do meio aquoso num dos lados, para o meio membranar. As moléculas têm que quebrar as ligações com as moléculas vizinhas e solubilizar-se na membrana, o que do ponto de vista energético é um processo desfavorável. Para além disto, como a figura sugere, é um processo bastante lento, uma vez que a barreira energética a ser ultrapassada é grande.

Processo 2 – Para que a molécula se difunda ao longo do interior da membrana ela tem que passar uma série de barreiras energéticas menores, uma de cada vez que muda a sua posição na rede enquanto se difunde. Apesar de serem mais baixas, são muitas, de tal forma que este se torna o passo determinante na velocidade deste processo.

Processo 3 – A molécula tem que passar da membrana para o meio aquoso do outro lado. Este é o único processo que é favorável do ponto de vista energético, uma vez que a partícula volta à fase aquosa onde as interações com o solvente são mais favoráveis.

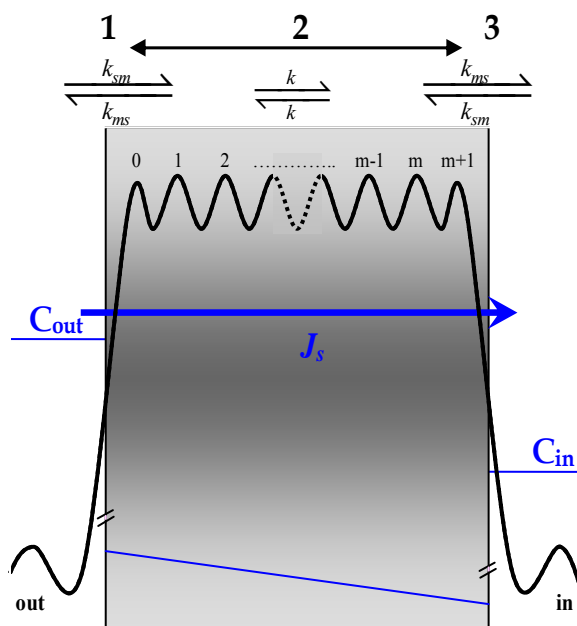


Figura I-3– Permeação através de uma membrana homogênea (Adaptado de [20])

A figura mostra em termos de barreiras energéticas (de 0 a $m+1$) os três processos (1, 2 e 3) pelos quais uma molécula permeante passa ao atravessar uma membrana. k_{sm} , k , k_{ms} representam as constantes de velocidade para a passagem das barreiras energéticas. A seta mostra o sentido do fluxo que se estabelece na membrana segundo o gradiente de concentração (C_{out} e C_{in}).

3.2. Permeação através de Canais

No caso de existirem canais a água poderá permear a membrana através destes.

Se existir soluto impermeante num dos lados de uma membrana, estabelece-se um gradiente de pressão hidrostática dentro de um canal que a atravessa [20]. É este gradiente de pressão hidráulica que induz o fluxo osmótico, a água é obrigada a fluir dentro do canal segundo o gradiente de pressão hidrostática gerado. Isto acontece mesmo quando temos os dois compartimentos à mesma pressão, como é ilustrado na Figura I-4(a). Assim, em membranas com poros permeáveis à água a osmose já não tem as características da difusão, em vez disso move-se como um todo como se descesse um canal.

O gradiente de pressão hidrostática que se gera dentro do canal só desaparecerá quando a pressão hidrostática no compartimento que tem o soluto aumentar compensando a pressão osmótica (Figura I-4 (b)), ou seja, quando a condição de equilíbrio osmótico ($\Delta\Pi=\Delta P$) (ponto 4 do ANEXO I) é atingida. A Figura I-4 ilustra uma situação de fluxo osmótico e uma situação em que o equilíbrio osmótico foi atingido.

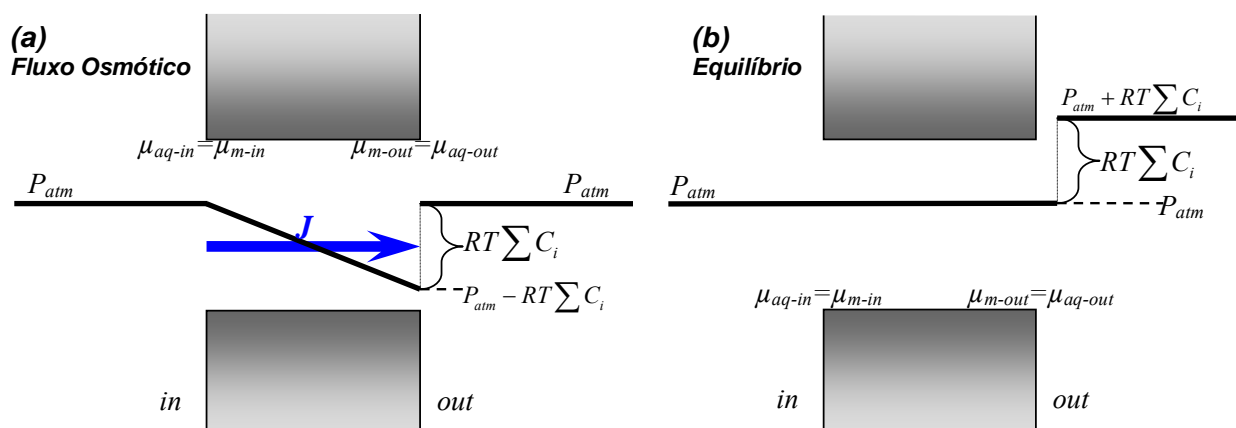


Figura I-4– Permeação de uma membrana pela água através de um canal (Adaptado de [20])

Ambas as figuras mostram o perfil de pressão hidrostática através de um canal que só deixa passar água. O lado out contém um soluto impermeante enquanto o lado in contém água pura. A presença do soluto impermeante do lado out cria uma descontinuidade na concentração da água na interface out. Mas por outro lado, um rápido equilíbrio nas interfaces, requer que aqui os potenciais químicos sejam contínuos. Então, para que os potenciais químicos da água na interface out sejam contínuos, tem de existir uma descontinuidade na pressão hidrostática oposta à pressão osmótica criada pelo soluto impermeante. (a) A pressão hidrostática cai ao longo do poro, criando um fluxo hidráulico através da membrana, mesmo que os dois compartimentos estejam à mesma pressão. (b) O equilíbrio é atingido quando a queda de pressão através do poro é anulada pela aplicação de uma pressão hidrostática $(P-P_{atm})=\Delta\Pi=RT\Sigma C_i$ do lado out,

3.3. Gradientes responsáveis pelo transporte de água

O transporte de água através de uma membrana pode dever-se a três forças propulsoras diferentes, provocadas por três gradientes diferentes: gradiente de

pressão hidrostática (P), gradiente de pressão osmótica (II) e gradiente de concentração de água (C*)[20]. A Figura I-5 ilustra as três situações:

- Na primeira, a água move-se devido a um gradiente de pressão hidrostática que se cria devido ao pistão que empurra a água para o outro lado.
- No segundo caso, a água move-se para o lado oposto (*out*) devido a um gradiente de pressão osmótica provocado pela adição de um soluto impermeante.
- No terceiro caso, coloca-se água marcada num dos lados e verifica-se que ela passa para o outro lado.

Em cada um dos casos verifica-se que o fluxo de água (J) que se estabelece através da membrana é proporcional ao gradiente:

$$J_f \equiv P_f \frac{\Delta P}{RT} \quad J_{osm} \equiv P_{osm} \frac{-\Delta \Pi}{RT} \quad J_d \equiv P_d \Delta C^* \quad {}^1 \text{Equação I-1}$$

À constante de proporcionalidade das equações chama-se coeficiente de permeabilidade P_f (filtração), P_{osm} (osmótico) e P_d (difusional) [20]. Este coeficiente representa o fluxo de água que se obtém por cada unidade de gradiente e, em cada caso, é característico da membrana.

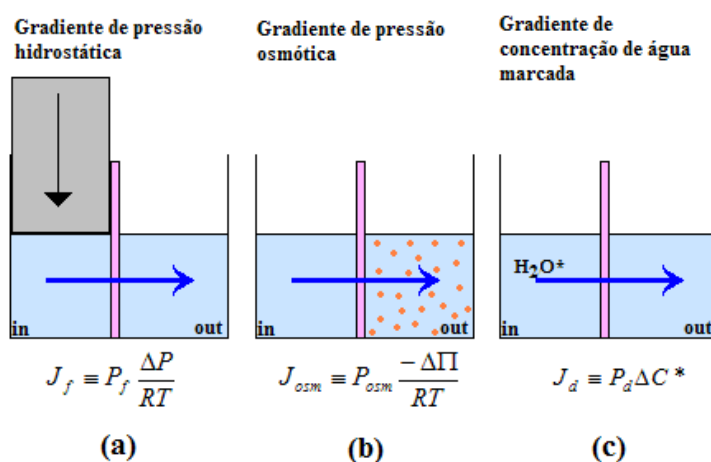


Figura I-5– Três formas de medir o fluxo de água através de uma membrana (Adaptado de [20])

É colocada uma membrana permeável à água entre dois compartimentos aquosos. Em cada caso é criado um gradiente: (a) Um pistão hidráulico empurra a água do lado in forçando-a a passar através da membrana para o lado out. (b) Um soluto impermeante colocado do lado out cria uma pressão osmótica forçando a água a passar através da membrana para o lado out. (c) Do lado in é colocada água marcada que se difunde para o lado out segundo o seu gradiente de concentração.

¹ Os termos RT são incluídos nas duas primeiras equações para que as unidades dos gradientes venham em mol cm⁻³. Os fluxos assim obtidos deverão vir, evidentemente, em mol s⁻¹ cm².

O sinal de menos na equação de fluxo osmótico evidencia o facto de a água se deslocar no sentido crescente do gradiente, das pressões osmóticas baixas para as altas.

Numa situação em que estejam presentes os três gradientes, o fluxo total de água (J_T) será o somatório dos todos os fluxos:

$$J_T = \sum J = J_f + J_{osm} + J_d = P_f \frac{\Delta P}{RT} + P_{osm} \frac{-\Delta \Pi}{RT} + P_d \Delta C^* \quad \text{Equação I-2}$$

Por um lado, os fluxos são normalmente medidos em termos de volume por unidade de tempo por unidade de área ($\text{cm}^3 \text{ s}^{-1} \text{ cm}^{-2}$) e não em termos molares ($\text{mol.s}^{-1}.\text{cm}^{-2}$) [20]. Ao primeiro chamamos fluxo volúmico (J^V) e ao segundo fluxo molar (J^{molar}). Os dois relacionam-se da seguinte forma:

$$J^V = V_w \times J^{\text{molar}} \quad \text{Equação I-3}$$

onde V_w é o volume molar da água.

Por outro lado pode ser demonstrado que os três coeficientes de permeabilidade são idênticos em membranas não porosas [20] onde o único mecanismo de passagem é a difusão através da camada lipídica (as moléculas de água permeiam a membrana individualmente sem interagirem umas com as outras). No entanto, em membranas porosas, as moléculas não se movem independentemente umas das outras e tem sido verificado que embora $P_f = P_{osm}$ (o que faz sentido pois em termos de forças a pressão hidrostática e osmótica são equivalentes) estes são muito maiores que P_d [20]. Portanto, P_f é sempre igual a P_{osm} , chamemos P_f a ambos.

Então a Equação I-2 fica:

$$J^V = P_f V_w \left(\frac{\Delta P}{RT} - \frac{\Delta \Pi}{RT} \right) + P_d V_w \Delta C^* \quad \text{Equação I-4}$$

No caso de não termos gradiente de água marcada,

$$J^V = \frac{P_f V_w}{RT} (\Delta P - \Delta \Pi) \quad \text{Equação I-5}$$

3.4. O coeficiente de permeabilidade osmótica

O coeficiente de permeabilidade osmótica à água (P_f) é o parâmetro mais útil na caracterização do transporte de água através de uma barreira [18]. P_f relaciona o

fluxo volúmico total através da barreira com os gradientes osmótico, hidrostático e difusional [18][20].

Para barreiras membranares simples, como bicamadas planas, liposomas e membranas celulares, o valor absoluto de P_f permite-nos prever se o transporte é facilitado por poros, tais como as AQPs ou se o transporte de água se dá através da bicamada lipídica [18]: Valores de P_f superiores a $0,01 \text{ cm s}^{-1}$ (25 – 37°C) são considerados altos e sugerem o envolvimento de canais de água; valores de P_f inferiores a $0,005 \text{ cm s}^{-1}$ são considerados baixos, sendo consistentes com a difusão da água através da porção lipídica da membrana [21].

A interpretação dos P_f medidos depende de medições rigorosas da área (A) das membranas e da ausência de efeitos de camadas não agitadas²[21].

3.5. Energia de activação de Arrhenius

Como foi visto, a água pode permear a membrana por dois processos distintos: através da camada bilipídica ou através de canais. A determinação da via dominante é possível pela avaliação da energia de activação (E_a) do transporte. Na ausência de canais, a água movimenta-se exclusivamente através da camada bilipídica, sendo a energia de activação medida para o transporte elevada ($>14 \text{ kcal/mol}$). Na presença de canais funcionais, a energia de activação é baixa ($< 4 \text{ kcal/mol}$) [35]. A Figura I-6 ilustra esta situação.

A energia de activação de Arrhenius é definida como sendo a relação entre:

$$\ln P_f = \frac{E_a}{RT} + A' \quad \text{Equação I-6}$$

em que R é a constante dos gases perfeitos, T a temperatura absoluta e A' um termo entrópico.

O valor de E_a pode ser extraído a partir do declive da representação gráfica de Arrhenius que relaciona $\ln P_f$ com $1/T$. O valor de E_a constitui uma medida da energia envolvida no movimento da água através da membrana. Os canais de água baixam a energia de activação e o transporte de água através destas membranas é menos dependente da temperatura do que a difusão da água através da camada bilipídica.

² No presente trabalho, por estarmos a trabalhar com vesículas e por usarmos a técnica do fluxo interrompido, não temos a interferência deste efeito.

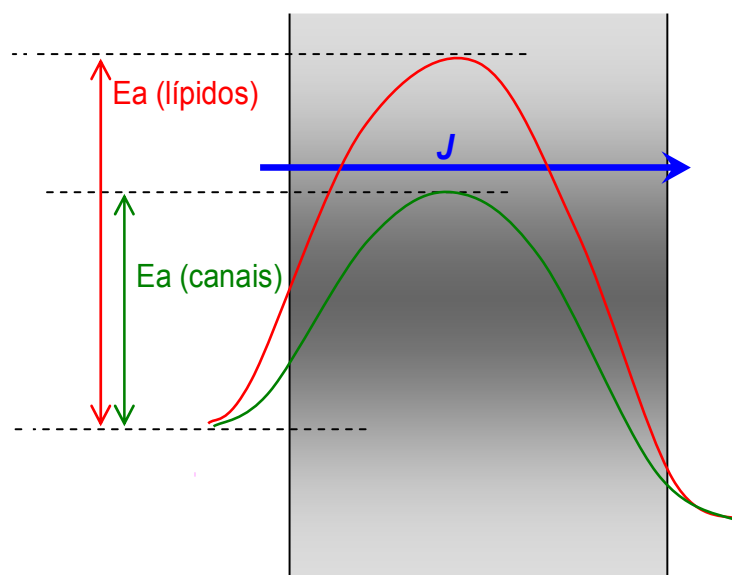


Figura I-6 – Energia de activação para a permeação através dos lípidos da membrana ou através de canais

A figura mostra as barreiras energéticas para a passagem da água através dos lípidos da membrana e através de um canal³. A Energia de activação é sempre maior para a permeação através dos lípidos da membrana do que para a permeação através de canais.

4. TRANSPORTE DE SOLUTO ATRAVÉS DE MEMBRANAS

Tal como a água, um soluto como por exemplo o glicerol pode permear a membrana através da camada bilipídica ou através de canais.

4.1. Gradiente responsável pelo transporte de glicerol

No transporte de soluto não carregado através de uma membrana, supondo que não existe gradiente de pressão hidrostática, a única força propulsora para o seu fluxo é o seu gradiente de concentração (ΔC_S). A Figura I-7 ilustra essa situação.

Verifica-se que o fluxo de soluto (J_S) que se estabelece através da membrana é proporcional ao gradiente:

$$J_S^{molar} \equiv P_S \Delta C_S \quad \text{Equação I-7}$$

Tal como para a água, a constante de proporcionalidade da equação chama-se coeficiente de permeabilidade do soluto s (P_S) e representa o fluxo de soluto que se obtém por cada unidade de gradiente e é característico da membrana.

³ Os traçados não devem ser considerados de forma absoluta na medida em que ao longo do caminho a molécula vai encontrando várias barreiras à sua passagem como é ilustrado para o caso da permeação da camada lipídica pela água na Figura I-3.

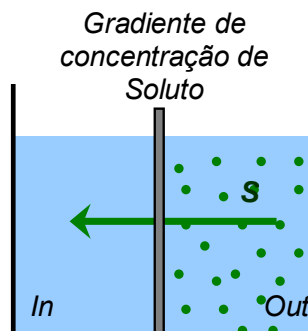


Figura 1-7 – Fluxo de glicerol através de uma membrana

É colocada uma membrana permeável ao soluto entre dois compartimentos aquosos.

O lado out contém o soluto *s* ao qual a membrana é permeável, do lado in encontra-se um outro soluto ao qual a membrana é impermeável na mesma concentração que o soluto *s* de tal forma que no instante inicial não se observam fluxos de água. Desta forma é criado um gradiente de concentração de *s* ao longo da membrana. Este difundir-se-á através da membrana segundo o seu gradiente.

4.2. Coeficiente de Permeabilidade ao Glicerol

O glicerol é um soluto não carregado que pode permear a membrana. O coeficiente de permeabilidade ao glicerol (P_{gly}) é também um parâmetro útil na caracterização do seu transporte através de uma barreira. P_{gly} relaciona o fluxo volumico total através da barreira com o gradiente de concentração. Os valores de P_{gly} determinados em membranas biológicas são várias ordens de grandeza inferiores aos encontrados para a água.

4.3. Energia de activação de Arrhenius

O glicerol pode permear a membrana por dois processos distintos: Através da camada bilipídica ou através de canais. A determinação da energia de activação (E_a) do transporte deverá da mesma forma possibilitar a avaliação da via dominante.

A energia de activação de Arrhenius é determinada de forma idêntica à descrita para a água. A expressão a usar é:

$$\ln P_{gly} = \frac{E_a}{RT} + A' \quad \text{Equação 1-8}$$

Em estudos publicados na literatura, foi referida uma energia de activação de 16 kcal/mol como correspondendo a um transporte não facilitado por canais [37] e energias de activação da ordem das 6 kcal/mol como correspondendo a um transporte de glicerol facilitado por canais [48].

5. CANAIS DE ÁGUA: AQUAPORINAS

As aquaporinas (AQPs) são proteínas intrínsecas de membrana (MIP) capazes de transportar água⁴. Encontradas em espécies desde bactérias e fungos, plantas e humanos, as sequências de mais de 150 aquaporinas são hoje conhecidas. Constituem uma família de MIP altamente conservada. Todas contêm uma sequência Asn-Pro-Ala (NPA) perto do seu centro de selectividade [22].

Até hoje já foram identificadas 13 AQPs em mamíferos, distribuídas por diferentes células do organismo, tendo sido a AQP1 a primeira a ser identificada nas membranas do glóbulo vermelho e mais tarde nas membranas do túbulo proximal do rim de mamífero. Actualmente sabe-se que as AQPs estão amplamente distribuídas pelas células dos vários órgãos. Apesar da sua função específica não ser inteiramente clara, sabe-se que estas proteínas desempenham um papel relevante no transporte de água e na regulação do volume celular. Na realidade, o coeficiente de permeabilidade à água da AQP1 é extremamente elevado (aproximadamente $20 \times 10^{-3} \text{ cm s}^{-1}$ em AQP1 expressa em oócitos [15]). Note-se ainda que, para além das aquaporinas existem outras proteínas que aparentemente também transportam água. Foi demonstrado o transporte osmótico de água associado ao transportador de glucose, ao transportador de ureia e a múltiplos canais de Na^+ . Aparentemente estes transportadores contêm poros de passagem para a água que em alguns casos podem ser fechados. No entanto a densidade membranar destes transportadores é bastante inferior à das AQPs, tornando pouco claro se poderão ter uma contribuição significativa para a permeabilidade total à água da membrana [18].

5.1. Selectividade das AQPs

As AQPs dividem-se em dois grandes grupos: As AQPs ortodoxas e as aquagliceroporinas (AQP3, 7, 9 e 10). As primeiras são selectivas para a água e excluem todas as outras moléculas inclusive protões, de modo a assegurar a manutenção do potencial electroquímico através da membrana [22]. As segundas, para além de água também transportam glicerol e outros solutos de pequenas dimensões (Figura I-8).

A significância fisiológica da permeação do glicerol ainda não é bem compreendida. No entanto a presença da AQP7 nos adipócitos e da AQP9 nos

⁴ Apesar disto algumas aquaporinas apresentam uma permeabilidade à água extremamente baixa, como é o caso da AQP6.

hepatócitos sugere que as suas permeabilidades ao glicerol sejam importantes no metabolismo das gorduras. Os triglicéridos são degradados nos adipócitos e a AQP7 pode providenciar uma via de saída para o glicerol, enquanto a AQP9 uma via de entrada para o interior dos hepatócitos onde ocorre a gluconeogénese. Adicionalmente, a função da AQP7 tem sido relacionada com o desenvolvimento de obesidade em ratinhos com a deleção do gene da aquaporina e em humanos [11]. No entanto ainda não foi feita uma caracterização cinética da função no transporte de água e de glicerol da AQP7 nos adipócitos.

Estas AQPs também existem noutros tecidos, nomeadamente no rim, estando o seu papel aí relacionado com a reabsorção tubular de glicerol para posterior utilização no metabolismo hepático (via AQP9).

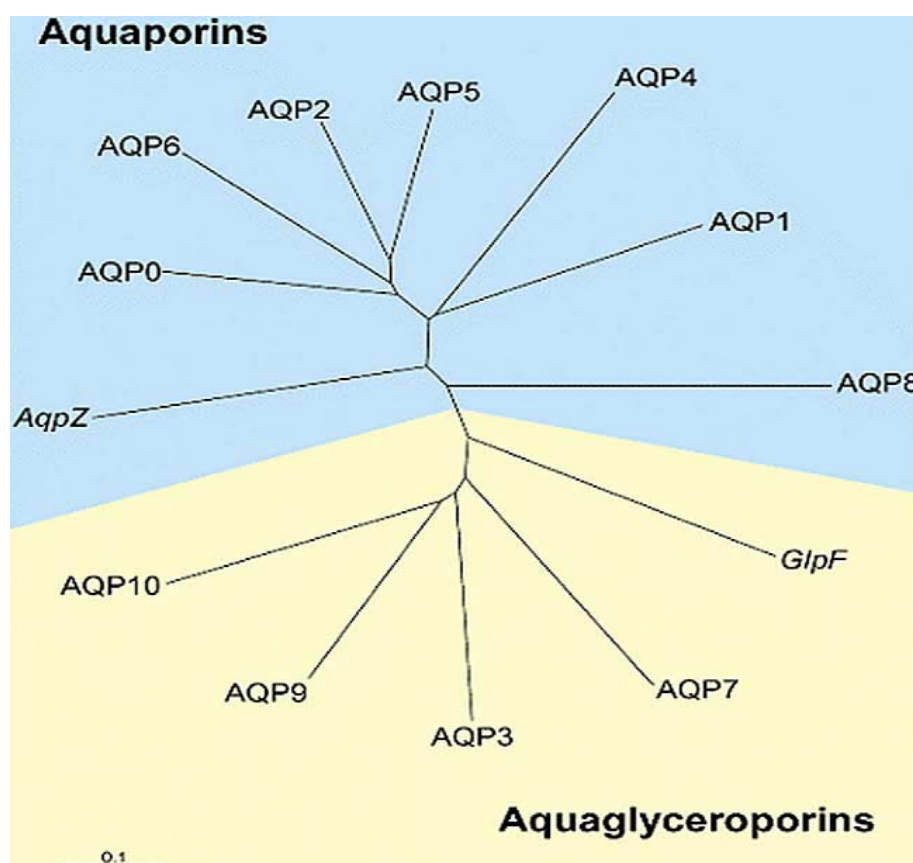


Figura I-8 – Aquaporinas de mamíferos e de *E. coli* [16]

A figura mostra uma árvore filogenética de algumas aquaporinas de mamíferos e de *E. coli*, a divisão foi efectuada com base em sequências do cDNA.

Na zona de cima mostram-se aquaporinas com elevada permeabilidade à água. Na zona em baixo mostram-se as aquagliceroporinas com permeabilidade à água bem como ao glicerol.

Tem-se tornado claro que as propriedades de transporte das aquaporinas são ainda mais diversas, não se restringindo a permearem apenas a água e o glicerol.

Demonstrou-se que a AQP6 também conduz aniões e que aparentemente a AQP1, quando expressa em oocitos, apresenta uma ligeira permeabilidade ao CO₂ [15].

Hoje sabe-se que pelo menos algumas aquaporinas estão sujeitas a regulação [51] [50]. [15].

A AQP1 foi a primeira aquaporina ortodoxa cuja estrutura foi elucidada e relacionada com a selectividade do canal para a água [49]. Deste modo, vamos em seguida fazer uma breve abordagem aos aspectos relevantes para a sua função como canal.

5.2. Aquaporinas ortodoxas: a AQP1

5.2.1. Estrutura da AQP1

A AQP1 foi identificada nas membranas como um tetrâmero (Figura I-9), cada monómero sendo constituído por 269 aminoácidos organizados em 6 hélices alfa transmembranares, ligadas por 5 ansas e duas meias hélices.

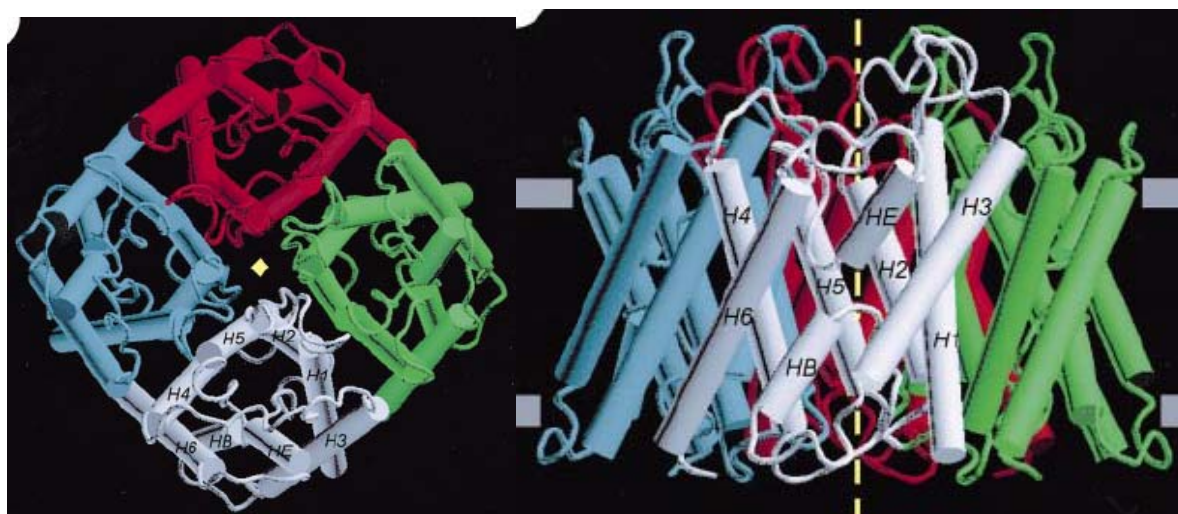


Figura I-9 – Vista de topo e vista lateral do tetrâmero da AQP1 [17]

Cada monómero está representado por uma cor diferente. No monómero a cinzento evidenciam-se as 6 hélices transmembranares (H1 a H6) e as duas meias hélices das ansas (HB e HE). A vista lateral mostra as hélices estendendo-se de um a outro extremo da membrana representada pelos dois traços paralelos cinzento.

Duas das ansas contêm uma sequência Asn-Pro-Ala (NPA) conservada em todas as AQPs conhecidas [14]. Estas hélices estão organizadas em dois grupos distintos que se juntam formando um canal interior por onde passam as moléculas de água. As sequências NPA formam uma argola apertada que faz parte da

superfície do poro de passagem para a água (Figura I-10), dando a este poro o aspecto de uma ampulheta.

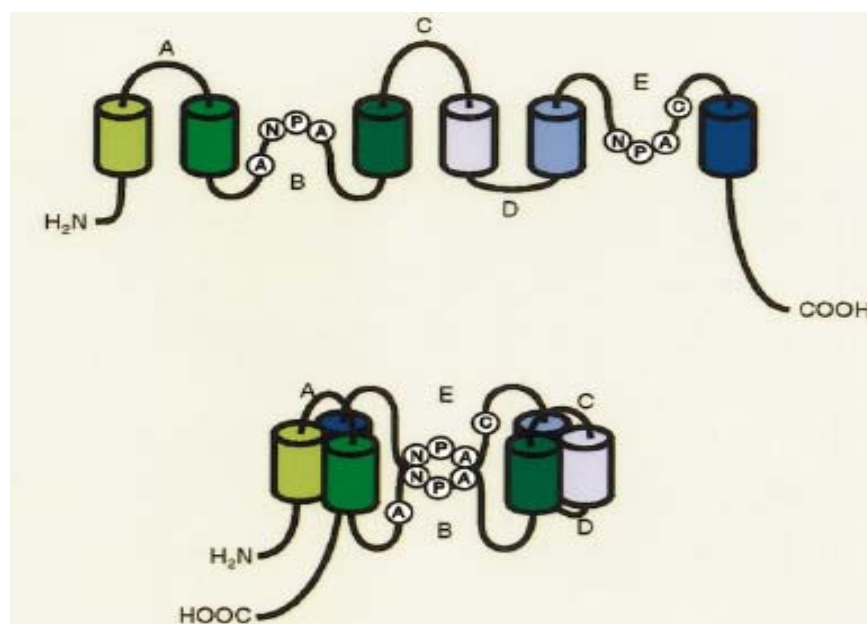


Figura I-10 – Organização estrutural dos monômeros de AQP1 [15]

Cada monômero está organizado em 6 hélices (representadas por cilindros na figura) e duas meias hélices (não representadas). Estas hélices estão ligadas por 5 ansas (linhas a preto A a E).

Perto das sequências (NPA) existem dois resíduos A e C responsáveis pela inibição do canal provocada pelo ácido p-cloromercurifenilsulfônico (PCMBs).

Os quatro monômeros reúnem-se para formar o tetrâmero. As moléculas de água passam através do canal interior, em cada um dos monômeros (Figura I-11).

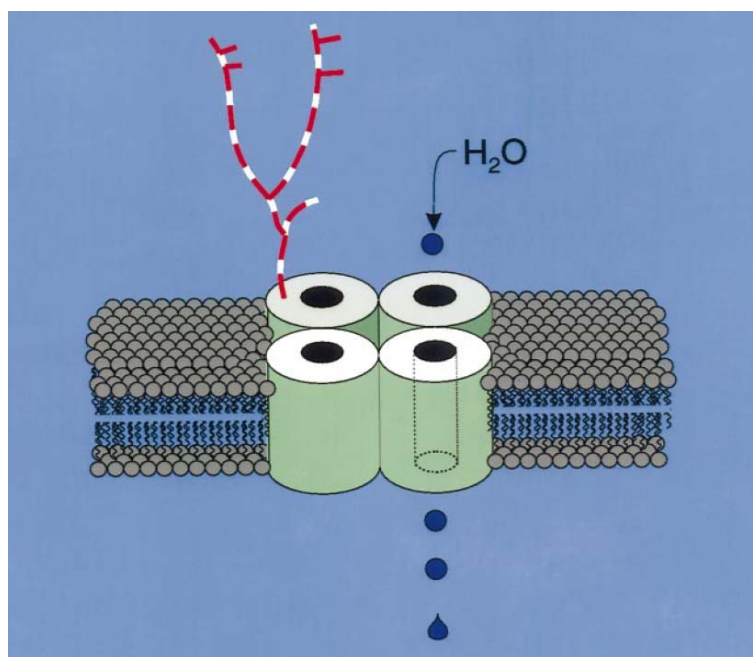


Figura I-11 – Organização estrutural do tetrâmero da AQP1 [15]

Na figura evidencia-se o tetrâmero de AQP1, formado por quatro monômeros idênticos com uma longa cadeia de glicano ligada a apenas um deles.

5.2.2. Mecanismo de permeação da água na AQP1

A forma do poro da AQP1 é a de uma ampulheta, larga nas extremidades e mais apertada no centro. Assim, as moléculas da coluna de água que atravessam o poro podem formar ligações de hidrogénio entre elas, mas à medida que avançam, o poro vai-se estreitando até ao ponto em que as moléculas são obrigadas a passar em fila única. A zona mais estreita do canal tem 2,8 Å de diâmetro excluindo solutos de maiores dimensões como por exemplo o glicerol. As duas meias hélices têm características especiais de dipolo com os pólos positivos muito próximos e orientados para o centro do canal. No centro do poro encontram-se as sequências NPA das ansas B e E mostradas na Figura I-10 que estão associadas por interações de Van der Waals. Os dipolos obrigam as moléculas de água a reorientarem-se favorecendo a ligação destas aos dois resíduos de aspargina das sequências NPA (Figura I-12). Isto resulta por um lado, numa resistência mínima à passagem de água (o transporte de água é extremamente rápido - 3×10^9 moléculas por monómero por segundo [17]), por outro resulta em que o protão não seja capaz de passar, visto que esta zona do poro está carregada positivamente.

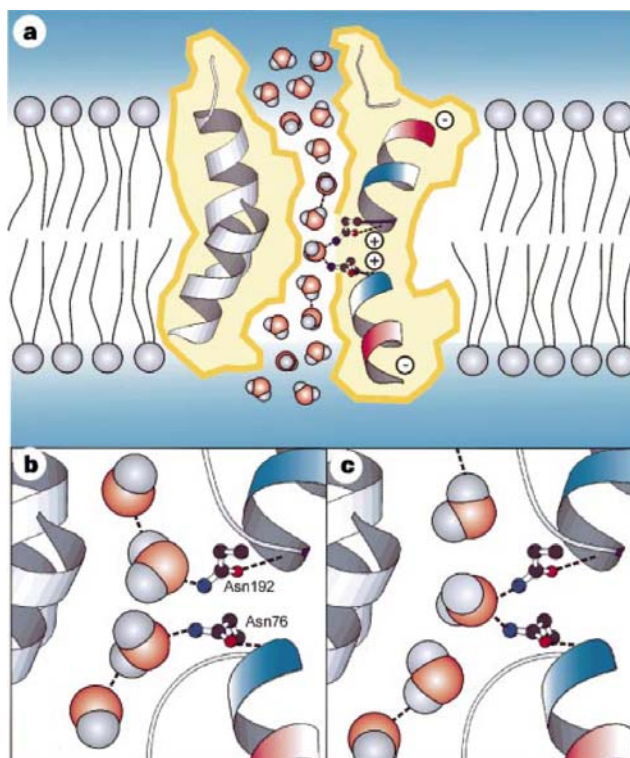


Figura I-12 – Representação esquemática do mecanismo de bloqueio à passagem do protão [17][15]

a) As cargas das meias hélices restringem a orientação das moléculas de água ao passarem por aquela zona de constrição do poro.

b) e c) As moléculas de água formam pontes de hidrogénio com dois resíduos de aspargina.

Para além disto, acima e abaixo da zona das sequências NPA, existem zonas de elevada hidrofobicidade (regiões aromáticas-arginina ar/R). Assim o movimento da água no canal assemelha-se a um movimento saltatório em que as moléculas de água saltam de interacção em interacção, pois a passagem pelas zonas hidrofóbicas é extremamente rápida uma vez que aqui elas não conseguem interagir com as paredes do canal. Esta zona funciona tanto como filtro de hidrofobicidade como filtro de tamanho, sendo algumas moléculas excluídas nesta zona por impedimento estérico. Desta forma, esta região apenas é permeada por pequenas moléculas polares.[23].

A direcção da água é determinada pelo gradiente osmótico.

5.3. Aquagliceroporinas

Uma vez que a estrutura de aquagliceroporinas de mamífero ainda não foi elucidada, apresenta-se a título de exemplo a GlpF (*E. coli* Glycerol facilitator), uma aquagliceroporina de *E. coli*, cuja estrutura e mecanismo de selectividade foram recentemente elucidados.

5.3.1. Estrutura da GlpF

As aquagliceroporinas têm uma estrutura muito semelhante às AQPs ortodoxas sendo no entanto permeáveis ao glicerol e a outros solutos de pequenas dimensões.

A GlpF é também um tetrâmero que cristaliza num arranjo simétrico de quatro canais por onde passa a molécula de glicerol. Cada monómero da GlpF, tal como na AQP1, está organizado em 6 hélices transmembranares e duas meias hélices empacotadas à volta de cada canal (Figura I-13).

As maiores diferenças encontram-se no espaço periplásmico. Nas aquagliceroporinas há consideravelmente mais aminoácidos na parte periplásmica do canal [24]. A região ar/R da GlpF é menos selectiva que a mesma zona na AQP1. Resíduos diferentes nas regiões ar/R da AQP1 e da GlpF dão um contributo importante para as características de permeação tão diferentes que têm estas duas aquaporinas [23], formando uma bolsa hidrofóbica que contribui para a atracção do glicerol e alditois lineares ao lúmen do canal a partir do exterior [24].

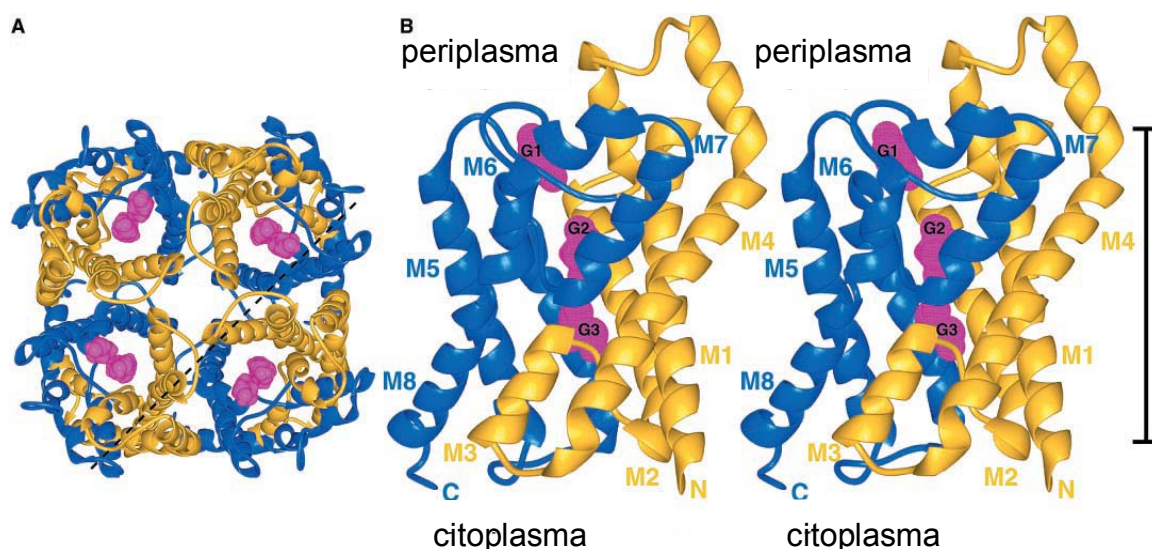


Figura I-13 – Representação esquemática da GlpF [22]

Representação tridimensional da GlpF com as hélices dos dois grupos distintos representados a amarelo e azul. As moléculas de glicerol que permeiam o poro estão representadas a magenta.

A – Vista de topo do tetrâmero da GlpF. A linha a tracejado representa o corte representado na figura B.

B – Vista lateral do monômero do canal de glicerol com as hélices numeradas de M1 a M8. A barra vertical representa a membrana celular.

O poro na GlpF também tem a forma de uma ampulheta, mas é mais largo que o poro da AQP1 como é mostrado na figura Figura I-14.

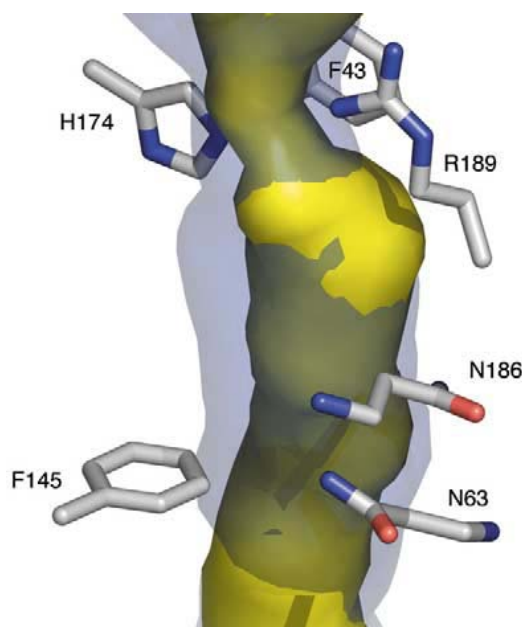


Figura I-14 – Vista lateral da superfície interna do canal na GlpF e na AQP1 [24]

Esta figura enfatiza o diâmetro maior do canal de glicerol na GlpF (cinza) comparativamente com o canal de água na AQP1 (amarelo).

5.3.2. Selectividade da GlpF

A principal barreira para a permeação de solutos através quer da AQP1 quer da GlpF está localizada na região ar/R. No entanto a GlpF é mais larga, mais

hidrofóbica e mais permeável a solutos pequenos (como por exemplo o NH_3 , CO_2 e O_2) sendo menos selectiva que a AQP1, formando no entanto uma barreira significativa contra a permeação pela ureia mas deixando passar a molécula de glicerol de uma forma eficaz [23].

Na AQP1 solutos grandes são excluídos estericamente, sendo a região ar/R da AQP1 um filtro tanto contra hidrofobicidade como tamanho. Este mecanismo não se aplica na GlpF [23]. Na GlpF, o ambiente na bolsa hidrofóbica permite a passagem de políeis cujos grupos hidroxilos podem interactuar com a Arg-206 repondo as pontes de hidrogénio água – Arg-206, onde o seu esqueleto apolar se adapta na bolsa hidrofóbica [22].

Em contraste com a região ar/R, os motivos NPA altamente conservados não estão envolvidos na selectividade para solutos não carregados. [23].

Surpreendentemente, não são as interacções soluto-poro, mas sim as interacções água-poro complementadas por efeitos estéricos, os determinantes chave que sustentam o mecanismo de selectividade e a barreira energética à passagem de solutos nas aquaporinas e aquagliceroporinas [23]. As moléculas de glicerol alinham-se num canal anfipático em fila única. No estreito filtro de selectividade do canal o esqueleto alquilo da molécula de glicerol é empurrado contra o canto hidrofóbico. Grupos hidroxilo sucessivos formam pontes de hidrogénio com um par de átomos dador e aceitador. Os dois motivos NPA conservados formam uma interface chave entre dois segmentos. Esta estrutura elucida acerca do mecanismo de permeabilidade selectiva para carboidratos e sugere como os iões e a água são excluídos [22].

5.4. Inibição das AQPs pelo Mercúrio

Os compostos de mercúrio como o HgCl_2 reduzem o transporte de água através da membrana por inibirem as aquaporinas. Nesta situação, a membrana apenas poderá ser permeada através da bicamada lipídica. O mecanismo preciso de inibição das AQPs pelo mercúrio ainda não foi totalmente elucidado, no entanto é sabido que os compostos de mercúrio ligam-se ao grupo tiol das cisteínas. Devido á sua afinidade para os tiois, o mercúrio tem sido útil como sonda química em processos biológicos mediados por proteínas bem como na descoberta de proteínas como canais de água. O uso de mercúrio como bloqueador do poro tem sido um instrumento útil na caracterização do canal das AQPs, revelando o seu papel no transporte membranar em numerosos tecidos [43].

6. TECIDO ADIPOSEO

O tecido adiposo é um tecido heterogêneo composto por diferentes tipos de células, predominantemente adipócitos, mantidas juntas por tecido conjuntivo que é vascularizado e enervado. Há dois tipos principais de tecido adiposo nos mamíferos, o tecido adiposo castanho (BAT) e o tecido adiposo branco (WAT).

O tecido adiposo WAT é o que se encontra nos depósitos de gordura visceral e subcutânea, e é o tipo predominante no ser humano.

6.1. Adipócitos

Os adipócitos do tecido WAT estão otimizados para o armazenamento de energia. No estado maduro, os adipócitos consistem numa grande gota central de lípidos, um pequeno núcleo deslocado para a periferia e algumas mitocôndrias. Os adipócitos BAT têm um maior número de mitocôndrias e são capazes de produzir energia em resposta a estímulos de baixa temperatura, apresentando um núcleo de localização central e pequenas gotas de lípidos.

Apesar de serem formados por uma gota central com cerca de 95% de triacilglicerol rodeada por uma margem extremamente fina de citoplasma, os adipócitos são células metabolicamente muito activas e sujeitas a um delicado controlo nervoso e hormonal bem como a influências nutritivas.

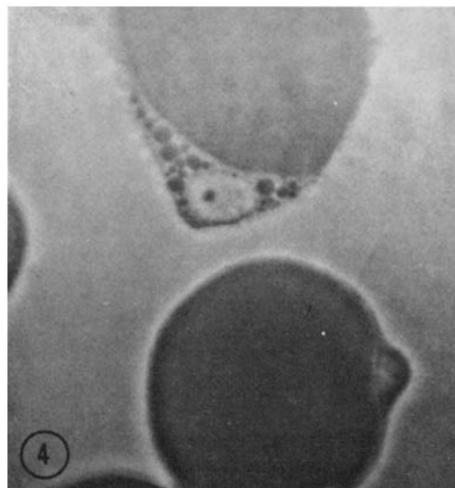


Figura I-15 – Adipócitos isolados [25]

É observável em ambas as figuras a grande gota de lípidos que ocupa a maior parte do espaço na célula. O citoplasma ocupa apenas a periferia da célula. Os organelos celulares encontram-se como que “esmagados” contra a membrana celular sendo o núcleo bem visível

A membrana plasmática dos adipócitos tem a particularidade de possuir numerosas pequenas invaginações chamadas *caveolae* que são um tipo especial de jangadas lipídicas, ricas em lípidos tais como esfingolípido e colesterol, podendo também conter proteínas.

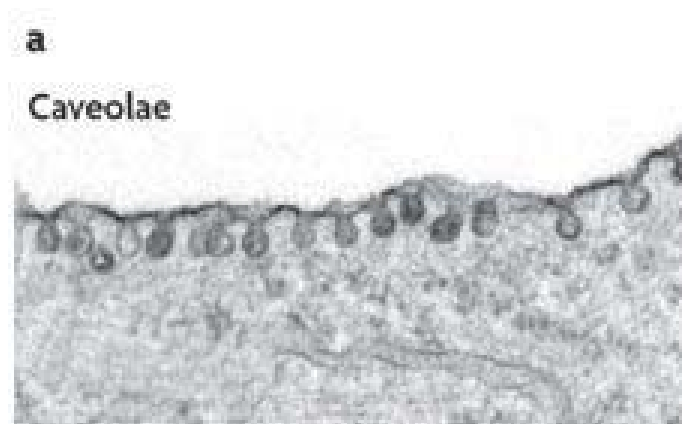


Figura I-16 – Pormenor da membrana plasmática dos adipócitos: *Caveolae* [26]

Durante períodos de excesso calórico os adipócitos prontamente convertem glucose em ácidos gordos armazenando-os, juntamente com os ácidos gordos recolhidos do espaço extracelular. Durante períodos de défice calórico, os triglicéridos armazenados pela célula são hidrolisados a ácidos gordos livres e glicerol [25], que saem da célula através de transportadores proteicos para serem levados a outros tecidos. O canal de glicerol identificado no tecido adiposo é uma aquagliceroporina, a AQP7 [12].

7. OBJECTIVOS

Este trabalho teve como objectivo estudar a influência do ácido linoleico conjugado (CLA) suplementado numa alimentação rica em gorduras saturadas provenientes de uma fonte vegetal e gorduras insaturadas provenientes de uma fonte animal, no transporte membranar de água e de glicerol do tecido adiposo de ratos obesos. Para isso, partiu-se de diferentes grupos de ratos Zucker alimentados com os dois tipos de gordura com e sem adição de CLA, e prepararam-se extractos de membranas isoladas de tecido adiposo de cada animal., que foram analisadas quanto à permeabilidade à água e ao glicerol. Paralelamente, calculou-se as energias de activação para estes dois mecanismos de transporte.

Adicionalmente, estas preparações de membranas foram avaliadas quanto ao seu teor de incorporação lipídica resultante do aporte alimentar, de modo a se poder correlacionar alterações de permeabilidade com diferenças na incorporação de ácidos gordos e CLA.

Capítulo II

MATERIAIS E MÉTODOS

1. ANIMAIS E DIETAS

1.1. Animais

O protocolo experimental deste estudo foi elaborado e revisto pela Comissão de Ética do CIISA/FMVe aprovado pela Comissão de Cuidados Animais da Autoridade Veterinária Nacional, (European Union guidelines N. 86/609/EEC). Tinta e dois ratos machos Zucker (Harlan Interfauna Iberica, S.L., Barcelona, Espanha) com 28 dias foram alojados individualmente com ambiente controlado à temperatura ambiente (22°C) com um fotoperíodo de 12 h. Após a chegada, os ratos foram alimentados com uma dieta standard comercial (Harlan Teklad Global Diets®2014, Harlan Interfauna Iberica, S.L.) sem suplementos durante uma semana. Após este período, os ratos foram distribuídos em quatro grupos com o mesmo peso corporal, com oito animais cada, e alimentados *ad libitum* com dietas aterogénicas (ricas em gordura) e água durante 14 semanas.

1.2. Composição das Dietas

As dietas foram baseadas em formulações standard AIN-93G modificadas para atingir regimes alimentares aterogénicos (Provimi Kliba, SA). Deste modo, quatro dietas foram enriquecidas com 2% (p/p) de colesterol, 0,5% (p/p) de colato de sódio (para melhorar a absorção de colesterol) e 15% (p/p) de gordura com diferença na composição de ácidos gordos. Deste modo, dois grupos foram alimentados com gorduras provenientes de óleos vegetais: Grupo P (11,25% (p/p) de óleo de palma e 3,75% (p/p) de óleo de girassol) e Grupo PCLA (11,25% (p/p) de óleo de palma, 2,53% (p/p) de óleo de girassol e 1,22% (p/p) de mistura de CLA). A mistura de CLA contém 40:40 dos isómeros c9,t11 e t10,c12. Os outros dois grupos receberam gordura de ovino em vez de óleo de palma, uma gordura que se sabe conter uma maior percentagem de ácidos gordos PUFA ómega 3: Grupo O (11,25% (p/p) de gordura de ovino e 3,75% (p/p) de óleo de girassol) e Grupo OCLA (11,25% (p/p) de gordura de ovino, 2,53% (p/p) de óleo de girassol e 1,22% (p/p) de mistura de CLA).

A inclusão de 1,22% (p/p) de mistura de CLA nas dietas representa aproximadamente 5% do total de ácidos gordos. A composição das dietas está sumarizada na Tabela II-1. O peso corporal e o aporte alimentar de cada rato foi medido duas vezes por semana. No final do período experimental, os ratos foram privados de alimento por 12 horas e decapitados após anestesia com isofluorano. A

gordura epididimal de cada animal foi excisada, pesada, congelada rapidamente em azoto líquido e guardada a -80°C para posterior análise.

Tabela II-1– Composição das dietas

	P	PCLA	O	OCLA
Ingredientes (%alimento)				
Caseína	20.0	20.0	20.0	20.0
Dextrose	13.2	13.2	13.2	13.2
Sacarose	11.9	11.9	11.9	11.9
Amido de milho	29.3	29.3	29.3	29.3
Celulose	5.0	5.0	5.0	5.0
Mistura de vitaminas	0.5	0.5	0.5	0.5
Mistura de minerais	2.4	2.4	2.4	2.4
Aminoácidos	0.3	0.3	0.3	0.3
Óleo de Palma	11.3	11.3	–	–
Gordura de Ovino	–	–	11.3	11.3
Óleo de Girassol	3.8	2.5	3.8	2.5
CLA	–	1.2	–	1.2
Colesterol	2.0	2.0	2.0	2.0
Ácido Cólico, sal sódico	0.5	0.5	0.5	0.5
BHT	0.01	0.01	0.01	0.01
Composição aproximada (% matéria seca)				
Proteínas	18.0	18.0	18.0	18.0
Gordura	15.0	15.0	15.0	15.0
Cinza	3.5	3.5	3.5	3.5
Fibras	3.5	3.5	3.5	3.5
Extracto livre de azoto	50.0	50.0	50.0	50.0

Grupos alimentares: P = óleo de palma; PCLA = óleo de palma + 1% CLA; O = gordura de ovino; OCLA = gordura de ovino + 1% CLA.

2. PREPARAÇÃO DAS VESÍCULAS DE TECIDO ADIPOSEO

Partiu-se de cerca de 7 g tecido adiposo proveniente da gordura epididimal de cada rato, alimentados com as diferentes dietas descritas em 1.2.

Para obter a preparação de vesículas membranares, a gordura foi cortada em pequenos pedaços retirando o tecido endotelial dos vasos sanguíneos visíveis, e homogeneizada com 200 ml de tampão (Manitol 100 mM, Hepes 10 mM, pH 7,4 com KOH; osmolaridade 120 mosM) num homogeneizador misturador durante 2 minutos. O homogenato foi em seguida filtrado através de tecido de nylon com 70 µm de poro de modo a eliminar o tecido vascular contaminante que fica retido nas malhas da rede. O filtrado foi centrifugado a 46 000 xg durante 45 minutos a 4°C. A gordura

contida nos adipócitos flutua á superfície e desta forma é facilmente separada do conteúdo e membranas celulares que se depositam no fundo do tubo. O pellet assim obtido foi ressuspenso em aproximadamente 1 ml de tampão e depois passado vigorosamente 20x por uma seringa com agulha 21G, procedimento que homogeneíza a suspensão e favorece a vesiculação das membranas.

As membranas celulares isoladas durante o processo formam vesículas de pequenas dimensões (aproximadamente 300nm).

A Figura II-1 apresenta um esquema do processo de obtenção das vesículas.

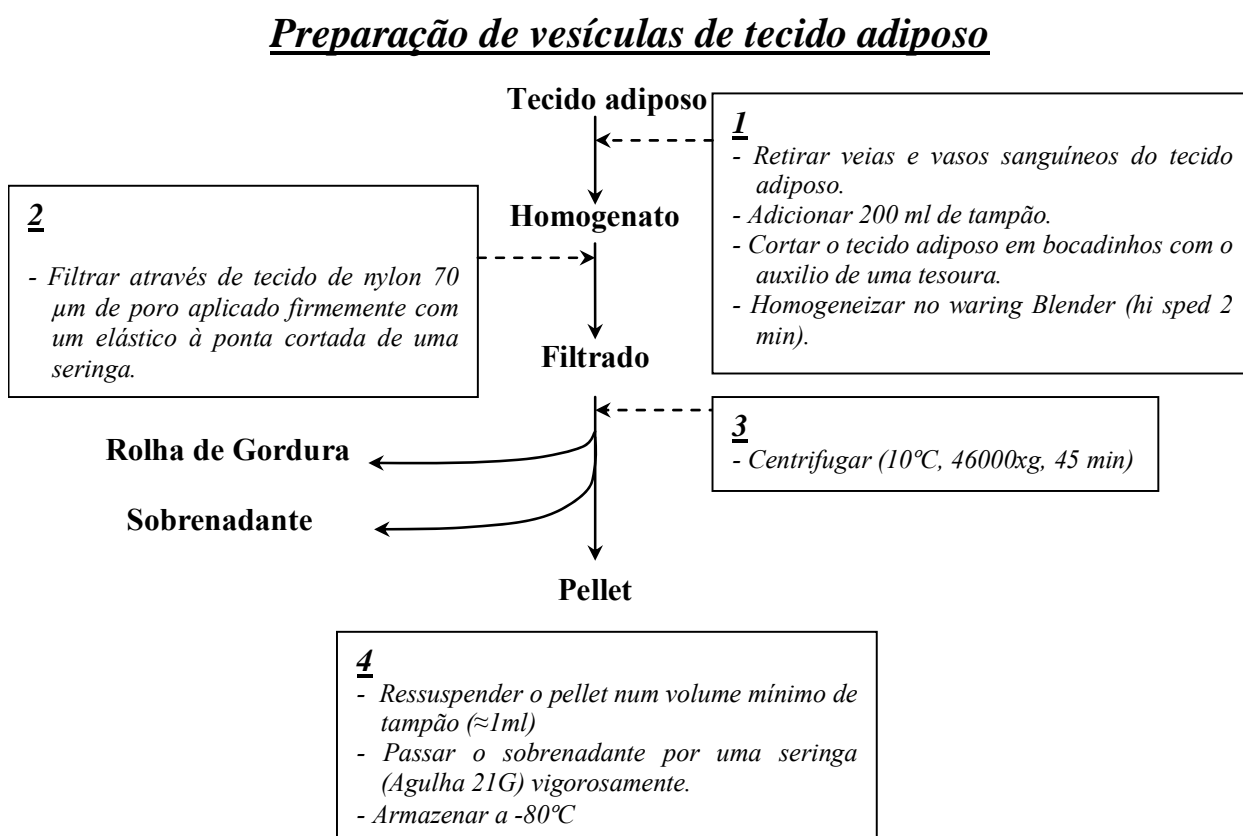


Figura II-1 – Esquema de preparação de vesículas de tecido adiposo

3. DETERMINAÇÃO DAS PROTEÍNAS TOTAIS

As proteínas totais foram doseadas pelo método de Bradford (anexo IV).

Para determinação das proteínas totais pipetou-se 10 µl de amostra (diluída conforme conveniência) para uma célula de espectrofotômetro, à qual se adicionou 190 µl de água destilada e 200 µl de reagente de Bradford. Preparou-se uma curva

de calibração usando padrões de albumina bovina com a concentração de 5, 10, 15, 20 e 25 µg/ml, conforme descrito na Tabela A 1 do anexo IV. Após 10 minutos à temperatura ambiente, as absorvências foram medidas a 595 nm contra um branco de água destilada em vez de amostra.

Para o cálculo da quantidade de proteínas presente em cada amostra usou-se a Equação A 24 do anexo IV.

4. DETERMINAÇÃO DAS OSMOLARIDADES DAS SOLUÇÕES

Todas as soluções usadas em estudos de permeabilidade foram aferidas quanto à sua osmolaridade por depressão crioscópica. Para isso, 150 µl da solução foram colocados num tubo de vidro apropriado procedendo-se à medição da sua osmolaridade num osmómetro Knauer semi-micro osmometer, type ML, nº 7322100000. Foram utilizados padrões de osmolaridade 0 e 400 mosM. A descrição do princípio e metodologia utilizados estão detalhados no ANEXO II.

5. DETERMINAÇÃO DO DIÂMETRO DAS VESÍCULAS

A determinação do diâmetro vesicular foi efectuada recorrendo à técnica de dispersão dinâmica da luz ou dispersão quasi-elástica da luz (QELS), usando um contador de partículas BI-90 Brookhaven Instruments.

Esta é uma técnica bem estabelecida, simples e relativamente rápida, com a vantagem de não ser perturbadora uma vez que as vesículas são medidas directamente na suspensão de trabalho. A dispersão dinâmica da luz, também conhecida como espectroscopia de correlação fotónica, mede o movimento browniano das partículas e relaciona-o com o tamanho das mesmas. Isto é feito fazendo incidir um raio laser nas partículas e analisando as flutuações na intensidade da luz dispersa provocadas.

Para a análise do diâmetro inicial de equilíbrio das vesículas de todas as preparações testadas, 10 µl de suspensão concentrada de vesículas foram depositados numa cuvete apropriada para QELS contendo 3 ml de solução de trabalho (Manitol 100 mM, Hepes 10 mM, pH 7,4 com KOH, osmolaridade 120

mosM) previamente filtrada por filtro de 22 μm para retirar poeiras. A cuvete foi colada no aparelho e a dispersão da luz foi detectada fazendo a média de 9 corridas, após o qual se calculou o diâmetro das partículas.

A descrição do princípio e metodologia da técnica utilizada está detalhada no ANEXO III.

6. TECNICA INTERRUPTÃO BRUSCA DE FLUXO

A técnica de interrupção brusca de fluxo (*sttoped flow*) permite efectuar estudos de cinéticas rápidas. Por este motivo é uma técnica que se aplica ao estudo de transporte de água e glicerol em vesículas de membrana.

Esta técnica baseia-se no facto de a intensidade da luz dispersa pela suspensão de vesículas ser proporcional ao tamanho das mesmas: As vesículas equilibradas num determinado tampão são rapidamente misturadas com soluções de osmolaridades diferentes, criando-se um gradiente osmótico entre o exterior e o interior da vesícula. Este gradiente osmótico provoca um movimento de saída ou entrada de água na vesícula, originando uma variação do seu volume, até que o novo equilíbrio osmótico seja atingido. Esta variação de volume reflecte-se numa variação da luz dispersa que é amplificada e registada.

Neste estudo o aparelho de fluxo interrompido utilizado foi um HI-TECH Scientific SF-61, com um tempo morto de 2 ms (tempo necessário para que as duas soluções se misturem), com controlo de temperatura, ligado a um microcomputador 80386 IBM PC/AT compatível.

Na Figura II-2 é apresentado um esquema de um aparelho de fluxo interrompido semelhante ao que foi usado neste trabalho:

Existem duas seringas de injeção de fluxo. Uma delas é cheia com uma suspensão das vesículas, equilibradas num tampão, a outra é cheia com uma solução de osmolaridade variável (hipo, iso ou hiperosmótica em relação ao tampão onde as vesículas estão equilibradas). A razão das osmolaridades das soluções externa (out) e interna (in) é definida como tonicidade e encontra-se explicada em detalhe no ANEXO II. O compressor injecta em simultâneo para a cuvete, através da câmara de mistura, volumes iguais das soluções contidas em cada uma das seringas (0.1 ml de cada seringa). Assim irá ser provocado um choque osmótico, pois as vesículas estão equilibradas numa solução de determinada osmolaridade e

de repente vêem-se com uma osmolaridade exterior diferente. As vesículas irão aumentar ou diminuir de volume conforme o choque seja hipo ou hiperosmótico, respectivamente. A intensidade da luz dispersa por esta suspensão irá variar ao longo do tempo com a variação do volume das vesículas. Assim, obteremos gráficos de I (intensidade da luz dispersa) em função de t (tempo).

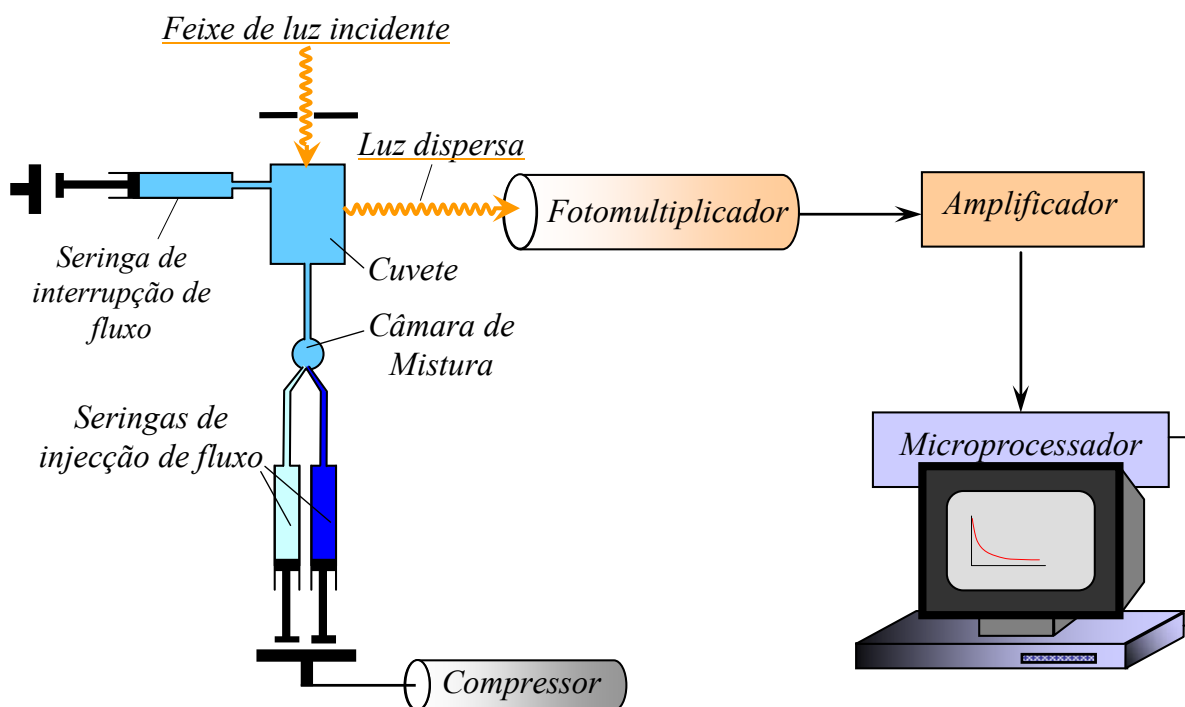


Figura II-2 – Esquema de um espectrofotômetro de fluxo interrompido (adaptado de [33]).

As Seringas de injeção de fluxo injectam as soluções para a cuvete, através da câmara de mistura. A cuvete é atravessada por um feixe de luz incidente de 400 nm, a luz dispersa é recolhida por um tubo fotomultiplicador colocado num ângulo de 90° e depois amplificada. Os dados são adquiridos no microprocessador.

Convém ainda referir que a escala de intensidade é uma escala arbitrária. Ela é medida em volts (V) sendo o operador que define a que voltagem corresponde o máximo e o mínimo de intensidade da luz dispersa.

No Gráfico II-1 apresentam-se a variação de luz dispersa por uma suspensão de vesículas quando estas são confrontadas com vários choques osmóticos (desde hipo-osmótico a hiper-osmóticos de intensidade variável) com um soluto impermeante. Observa-se uma variação de luz dispersa provocada pelo movimento de água e consequente variação de volume das vesículas, que se estabiliza quando é atingido o volume de equilíbrio.

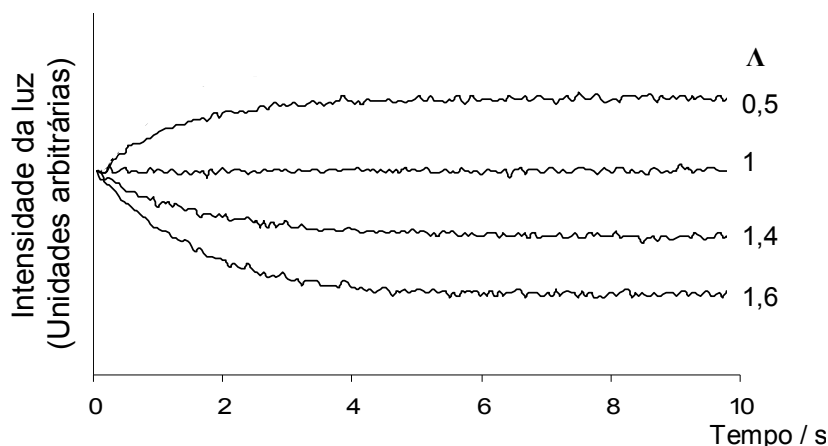


Gráfico II-1 – Sinais de variação de luz dispersa obtidos pela técnica de interrupção brusca de fluxo

Cada traçado representa o sinal obtido quando uma suspensão de vesículas equilibradas numa solução de determinada osmolaridade é injectada em simultâneo com um volume igual de uma outra solução de osmolaridade variável na cuvette. A tonicidade do choque osmótico é dada por $\text{osm}_{\text{out}}/\text{osm}_{\text{in}}$ e está assinalada para cada curva (a tonicidade 0,5 corresponde a um choque hiposmótico, a tonicidade 1 a um choque iso-osmótico e as tonicidades 1,4 e 1,6 a choques hiperosmóticos).

Quanto maior a tonicidade do choque osmótico ($\text{osm}_{\text{out}}/\text{osm}_{\text{in}}$) maior a amplitude do sinal. Quanto maior o gradiente osmótico aplicado ($\text{osm}_{\text{out}} - \text{osm}_{\text{in}}$) mais rapidamente a água se move e portanto maior a constante de tempo do processo.

No caso de termos um choque osmótico em que numa das seringas se encontra um soluto que permeia a membrana como é o caso do glicerol, esta técnica permite-nos também observar o seu movimento através das membranas.

Suponhamos que as vesículas estão equilibradas numa solução com um soluto impermeante e que a outra seringa contém uma solução com um soluto que permeia a membrana como o glicerol (normalmente com uma osmolaridade superior à da solução em que as vesículas estão equilibradas). Neste caso iremos observar numa primeira fase o efluxo de água em resposta ao aumento de osmolaridade da solução externa e numa segunda fase observa-se o influxo de glicerol acompanhado da reentrada de água. A movimentação da água em resposta ao choque osmótico ocorre mais rapidamente que a entrada do soluto permeante (glicerol) em resposta à sua diferença nas concentrações interna e externa e deste modo esta técnica permite analisar os dois fenómenos. O Gráfico II-2 apresenta um sinal de variação de luz dispersa obtido por fluxo interrompido ilustrando esta situação.

Para o estudo do transporte de água e glicerol, as preparações de vesículas obtidas foram diluídas ressuspensas na solução em que estavam equilibradas (Manitol 100 mM, Hepes 10 mM, pH 7,4 com KOH; osmolaridade 120 mosM) para se obter uma concentração de proteína de 0,15 mg/ml.

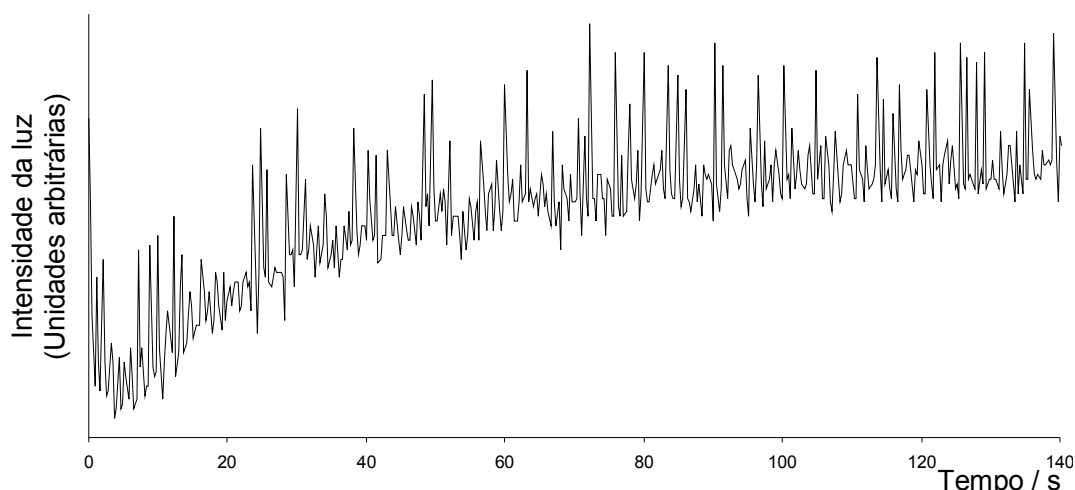


Gráfico II-2 – Sinal de variação da luz dispersa obtido por interrupção brusca de fluxo num choque hiperosmótico com glicerol

Uma suspensão de vesículas equilibradas numa solução com um soluto impermeante é injectada em simultâneo com um volume igual de uma solução hiperosmótica de glicerol. A intensidade do sinal da luz dispersa é seguida ao longo do tempo. Inicialmente observa-se um decréscimo da intensidade do sinal (efluxo de água). Depois a intensidade do sinal reverte-se, observando-se o seu aumento (Influxo de Glicerol acompanhado pela reentrada de água).

6.1. Transporte de água

Numa das seringas do aparelho de interrupção brusca de fluxo foram colocadas as vesículas equilibradas em (Manitol 100 mM, Hepes 10 mM, pH 7,4 com KOH, osmolaridade 120 mosM), na outra foi colocada uma solução de (Manitol 340 mM, Hepes 10 mM, pH 7,4 com KOH, osmolaridade 360 mosM), obtendo-se uma concentração final externa de 240 mosM (Equação A 18). Foram paralelamente feitos choques isotónicos com a solução de equilíbrio como controlo.

Os sinais foram recolhidos a temperaturas que variaram entre os 14°C e os 37°C.

6.2. Transporte de Glicerol

Numa das seringas do aparelho de interrupção brusca de fluxo foram colocadas as vesículas equilibradas em (Manitol 100 mM, Hepes 10 mM, pH 7,4 com KOH, osmolaridade 120 mosM), na outra foi colocada uma solução 360 mosM de Glicerol. Desta forma obteve-se uma concentração interna de 120 mosM de Manitol e uma concentração externa de 60 mosM de Manitol + 180 mosM de Glicerol, correspondendo a uma osmolaridade final externa de 240 mosM.

Os sinais foram recolhidos a temperaturas que variaram entre os 14°C e os 37°C.

7. DETERMINAÇÃO DOS COEFICIENTES DE PERMEABILIDADE A PARTIR DOS DADOS EXPERIMENTAIS

7.1. Coeficiente de Permeabilidade Osmótica (P_f)

Para a determinação do coeficiente de permeabilidade osmótica a partir dos resultados experimentais obtidos por interrupção brusca de fluxo assume-se que não há diferença de pressão hidrostática entre o interior e o exterior da vesícula e que não existe nenhuma outra espécie não difusível no interior da vesícula a não ser o soluto impermeante em que as vesículas foram equilibradas. Desta forma a quantidade total de moléculas deste soluto existentes no interior da vesícula permanecerá constante ao longo do tempo, isto é:

$$n = (C_{s-in})_t V_t = cte \quad \text{Equação II-1}$$

(onde n é nº de moléculas de soluto impermeante no interior da vesícula, C_{s-in} a concentração do soluto s no interior da vesícula, V o volume da vesícula e t um tempo t qualquer)

Assumindo que o soluto impermeante é a única espécie existente no interior da vesícula, então a concentração deste soluto é proporcional à osmolaridade medida, isto é: $C_{s-in} \propto Osm_{in}$. Então a Equação II-1 pode escrever-se da seguinte forma:

$$n \propto (Osm_{in})_0 V_0 = (Osm_{in})_\infty V_\infty = (Osm_{in})_t V_t = cte \quad \text{Equação II-2}$$

$$\text{Rearranjando tira-se que,} \quad \frac{(Osm_{in})_t}{(Osm_{in})_0} = \frac{V_0}{V_t} \quad \text{Equação II-3}$$

Em conjunto com a Equação A 16 e Equação A 17 se tira que:

$$\frac{(Osm_{in})_{\infty}}{(Osm_{in})_0} = \frac{V_0}{V_{\infty}} = \Lambda = \frac{Osm_{out}}{(Osm_{in})_0} \quad \text{Equação II-4}$$

7.1.1. A taxa de entrada de água (dV/dt) é proporcional à pressão osmótica criada pelo gradiente de concentração do soluto

Por outro lado o fluxo é a quantidade de água que se move por unidade de tempo por unidade de área isto é, é a taxa de entrada ou saída de água por unidade de área (A).

Tendo em conta a Equação I-5 e considerando, como já foi dito, que não há diferença de pressão hidrostática ($\Delta P=0$); recordando que para soluções diluídas $\Pi \equiv RT \sum C_i$; e substituindo a concentração por medidas de osmolaridade notando que Osm_{in} é função de t enquanto Osm_{out} pode ser considerado constante visto o volume de vesículas ser negligenciável em comparação com o volume total da solução, então este fluxo será proporcional à pressão osmótica criada pelo gradiente de concentração do soluto.

$$-J^V = \frac{dV}{A dt} = V_w P_f \Delta_{Osm} = V_w P_f ((Osm_{in})_t - Osm_{out}) \quad \text{Equação II-5}$$

Esta equação mostra-nos que o fluxo é máximo no instante inicial (quando quebramos o equilíbrio osmótico e a diferença de osmolaridades entre o meio interno e externo (ΔOsm é máxima), diminuindo progressivamente até se anular à medida que o equilíbrio osmótico se restabelece.

Desta equação se tira que:

$$\frac{dV}{dt} = A V_w P_f \Delta_{Osm} = A V_w P_f ((Osm_{in})_t - Osm_{out}) \quad \text{Equação II-6}$$

7.1.2. P_f pode ser calculado a partir dos parâmetros de ajuste do sinal a funções exponenciais

Considerando que o coeficiente de permeabilidade (P_f) e a área das vesículas são constantes, e tendo em conta os resultados obtidos na Equação II-3 e Equação II-4. A Equação II-6 pode ser integrada obtendo-se uma solução exacta [36].

Efectuando algumas aproximações e simplificações, chega-se à expressão:

$$\ln\left(\frac{V_{\infty}-V}{V_{\infty}-V_0}\right) = -kt$$

Equação II-7

onde,

$$k = V_w P_f \frac{A}{V_0} Osm_{out}$$

Equação II-8

isto é:

$$P_f = \frac{V_0}{AV_w} \frac{k}{Osm_{out}}$$

Equação II-9

Paralelamente, introduzindo o sinal da variação da luz dispersa, relacionando-o com o volume vesicular, e fazendo algumas aproximações [36] chega-se à expressão:

$$\ln\left(\frac{I_{\infty}-I}{I_{\infty}-I_0}\right) = -kt$$

Equação II-10

Portanto a expressão de I em função de t é uma exponencial:

$$I = I_{\infty} - (\Delta I)_{\infty} \cdot e^{-kt}$$

Equação II-11

Desta forma o parâmetro k, necessário para o cálculo de P_f pode ser retirado do ajuste dos pontos experimentais a uma exponencial simples⁵ (Equação II-11) em que os parâmetros de ajuste são: I_{∞} , ΔI e k. P_f é proporcional à constante de tempo k e pode ser retirado da Equação II-9.

No presente trabalho, este será o método usado para o cálculo de P_f , não obstante, existem outros métodos para o cálculo deste parâmetro.

7.1.3. Relação entre o volume vesicular e o sinal de luz dispersa

⁵ Caso o ajuste do sinal a uma exponencial simples não seja satisfatório, este poderá ser ajustado a uma exponencial dupla: $I = I_{\infty} - (\Delta I)_{\infty,1} \cdot e^{-k_1 t} - (\Delta I)_{\infty,2} \cdot e^{-k_2 t}$. Onde $(\Delta I)_{\infty,1}$ e $(\Delta I)_{\infty,2}$ correspondem à variação do sinal com cada uma das constantes de velocidade k_1 e k_2 , uma mais lenta e outra mais rápida. Este facto sugere a existência de duas populações com comportamentos osmóticos diferentes ou com tamanhos diferentes.

No decurso do choque osmótico o fluxo de água J_V , que permeia a membrana das vesículas de área A , provoca uma variação do volume vesicular. Este volume varia no tempo desde um volume inicial V_0 até um volume final V_∞ .

O Gráfico II-3 pretende ilustrar a variação do sinal de intensidade obtido pelo aparelho de fluxo interrompido devido a um choque hiperosmótico com água:

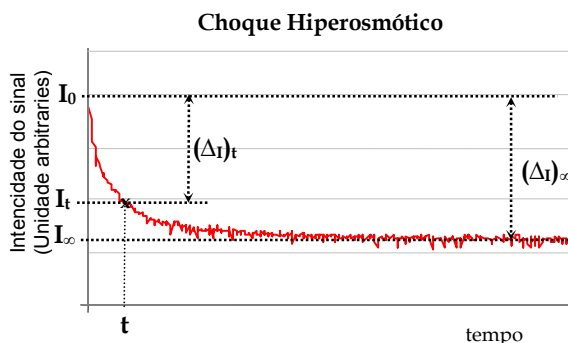


Gráfico II-3 – Sinal de fluxo interrompido devido a um choque hiperosmótico

Este gráfico mostra a intensidade do sinal da luz dispersa seguida ao longo do tempo numa suspensão de vesículas que sofre um choque hiperosmótico. Pretende-se ilustrar a variação da intensidade do sinal (ΔI). No instante inicial as vesículas ocupam um volume correspondente a uma intensidade I_0 . Depois observa-se um decréscimo da intensidade do sinal o que corresponde a uma diminuição do volume das vesículas, que ocorre devido à saída de água até se atingir o equilíbrio (I_∞).

A relação precisa entre a intensidade da luz dispersa e o volume vesicular é complexa, dependente do aparelho, e é geralmente feita uma aproximação a uma função empírica arbitrária [47].

Neste trabalho vamos assumir que a variação da luz dispersa (ΔI) durante o choque osmótico é proporcional à razão de volumes inicial e no tempo t , mais concretamente:

$$(\Delta I)_t = I_0 - I_t = a \frac{V_0}{V_t} + b \quad \text{Equação II-12}$$

Esta é a equação de uma recta onde b é a ordenada na origem e a o declive.

Rearranjando, obtendo-se:

$$I_t = I_0 - a \frac{V_0}{V_t} - b \quad \text{Equação II-13}$$

Tendo em conta a Equação II-4 note-se que a variação total da intensidade da luz dispersa será proporcional à tonicidade do choque:

$$(\Delta I)_\infty = a \frac{V_0}{V_\infty} + b = a \Lambda + b \quad \text{Equação II-14}$$

No entanto esta linearidade só é válida dentro de certos limites de tonicidade⁶ (Gráfico II-4).

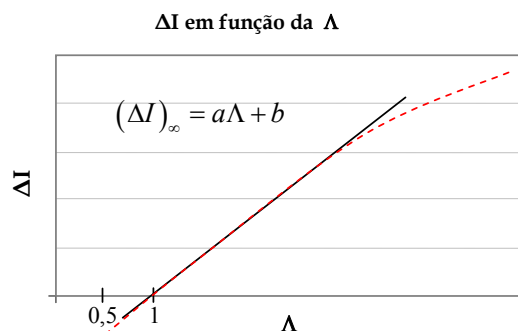


Gráfico II-4 – ΔI em função de Λ

Aqui ilustra-se um caso particular da Equação II-14. No entanto é preciso ter atenção que tal como ilustrado no gráfico, esta relação só é verdade dentro de certos limites de tonicidade. Desta forma deveremos garantir que estamos a trabalhar nesta zona de linearidade.

7.2. Coeficiente de Permeabilidade ao Glicerol (P_{Gly})

7.2.1. P_{Gly} pode ser calculado a partir dos parâmetros de ajuste do sinal a funções exponenciais

Para a determinação do coeficiente de permeabilidade ao glicerol a partir dos resultados experimentais usou-se a expressão [37]:

$$P_{Gly} = \frac{V_0}{A} k \quad \text{Equação II-15}$$

Onde o valor de k também é retirado da constante de tempo do ajuste da parte do sinal correspondente à movimentação do glicerol a uma exponencial simples [38] [37]

8. DETERMINAÇÃO DAS ENERGIAS DE ACTIVAÇÃO

Como já foi referido, para determinação das energias de activação a partir dos dados experimentais usa-se a Equação I-6 ou Equação I-8 para a água e para o glicerol, respectivamente:

$$\ln P_f = \frac{E_a}{RT} + A' \quad \text{ou} \quad \ln P_{Gly} = \frac{E_a}{RT} + A'$$

⁶ Isto apenas é verdade dentro de certos limites de tonicidade.

O valor de E_a é extraído a partir do declive da representação gráfica de Arrhenius representando $\ln P_f$ em função de $1/T$. Como na expressão tanto de P_f como de P_{gly} (Equação II-9 e Equação II-15) todos os parâmetros com excepção de k são constantes, a representação gráfica de $\ln k$ vs $1/T$ terá o mesmo declive e pode ser usada da mesma forma.

Para tal efectuam-se ensaios de interrupção brusca de fluxo a várias temperaturas.

9. CROMATOGRAFIA GASOSA

A cromatografia gasosa (GC) é uma técnica de separação e análise de misturas que usa como princípio básico a interacção dos componentes da mistura entre uma fase estacionária e uma fase móvel. Este método permite uma separação de misturas complexas.

Na fase móvel é utilizado um solvente e a fase estacionária consiste em substâncias adsorventes dispersas, tal como o gel de sílica ou de alumina. A cromatografia é baseada em diferenças de afinidade das substâncias a separar para com a fase móvel ou a fase estacionária. Quanto maior a afinidade para a fase móvel e menor para a estacionária, mais rapidamente a substância será eluída da coluna. Deste modo, o tipo de fase móvel, fase estacionária, comprimento e diâmetro interno da coluna, são parâmetros importantes para uma boa separação dos componentes da mistura. Assim o tempo de retenção de cada ácido gordo será diferente e portanto chegará ao fim da coluna num tempo diferente. A utilização de um padrão de cada ácido gordo que se pretende detectar (e que será eluído com o mesmo tempo de retenção) permite identificar a que ácido gordo corresponde cada pico que se vai obtendo.

A cromatografia gasosa utilizada neste estudo separa os ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) em colunas capilares de sílica com fases de elevada polaridade Utilizou-se um cromatógrafo Varian CP-3800 (Varian Analytical Instr., Walnut Creek, CA, USA) equipado com um detector de ionização de chama (FID) e uma coluna capilar Omegawax 250 (Supelco, Bellefont, CA, USA) de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μ m de espessura da camada da fase estacionária. O sistema de injeção automática foi mantido a 250°C e o detector a 220°C. Foi injectada 1 μ l de amostra com uma razão de split de 10:1. A temperatura

do forno foi programada para iniciar a 150°C durante os primeiros 11 minutos, depois subiu a 3°C/min até aos 210°C, mantendo-se a esta temperatura durante 30 minutos.

À medida que os ácidos gordos vão sendo extraídos o computador vai registando e desenhando um gráfico, no qual cada pico corresponde a um ácido gordo distinto. Quanto maior for o pico, maior a quantidade do ácido gordo presente. Os picos dos ácidos gordos depois de registados são integrados. Da integração do pico obteve-se o valor da quantidade do ácido gordo em questão. A quantificação dos ácidos gordos foi efectuada assumindo a proporcionalidade das áreas dos picos para todos os ésteres metílicos e comparando os seus tempos de retenção com o tempo de retenção do padrão.

A quantificação foi efectuada através do cálculo da percentagem de um determinado ácido gordo em relação ao total de ácidos gordos presente na amostra, através da equação:

$$\% \text{ ácido gordo } y = \frac{\text{área do ácido gordo } y}{\text{área total}} \times 100$$

Equação II-16

A quantificação dos ácidos gordos, expressa em mg por g de massa seca (MS), foi efectuada assumindo a presença de padrão interno (PI) nas amostras e a proporcionalidade das áreas dos picos, calculado através da seguinte equação:

$$\text{ácido gordo } y \left(\text{mg/g}_{\text{de massa seca}} \right) = \frac{\text{área do ácido gordo } y}{\text{área do PI}} \times \frac{\text{mg(PI)}}{\text{MS de amostra}}$$

Equação II-17

Capítulo III

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. CARACTERIZAÇÃO DAS VESÍCULAS DE TECIDO ADIPOSEO

A Figura III-1 apresenta uma imagem de microscopia de um corte de tecido adiposo usado neste estudo.

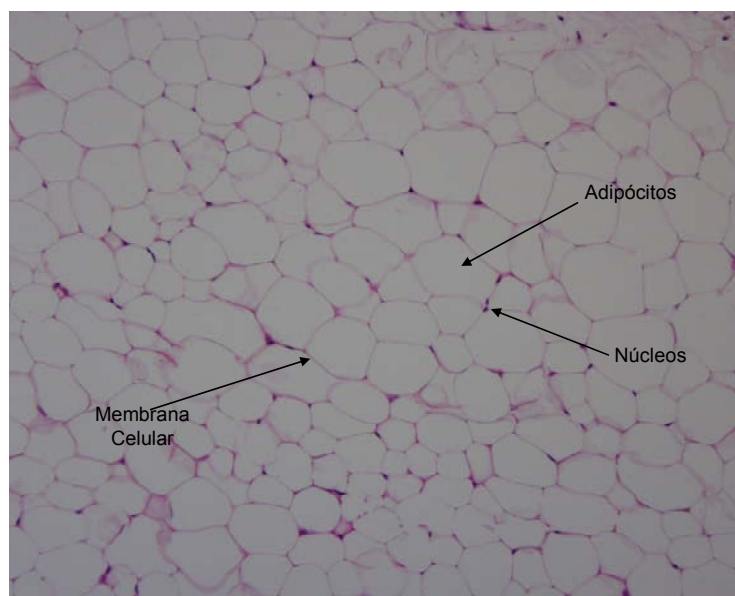


Figura III-1 – Observação ao microscópio de um corte de tecido adiposo

Corte de 10 μ m de Tecido Adiposo de em Bloco de Parafina (microscópio óptico x100; coloração Hematoxilina & Eosina)

Não foram encontrados na literatura referências a estudos de permeabilidade em membranas de adipócitos recorrendo à técnica do fluxo interrompido. Para a obtenção de preparações enriquecidas em membranas plasmáticas de adipócitos, foram tentadas várias abordagens experimentais. As diferentes metodologias e técnicas descritas na literatura para a obtenção de membranas plasmáticas não nos permitiram obter a quantidade de material suficiente para efectuar estudos de transporte recorrendo à técnica de fluxo interrompido. Deste modo e com vista à obtenção do material suficiente de cada rato que permitisse estudos de transporte e simultaneamente assegurasse um número de animais com significado estatístico, optou-se por fazer uma preparação da totalidade do tecido adiposo. Este procedimento é justificável, uma vez que este tecido tal como é visível na Figura III-1 é maioritariamente constituído por células de adipócitos, o que levará à obtenção de uma preparação rica em membranas destas células e não de outras. Por outro lado e uma vez que este é um estudo comparativo, espera-se que eventuais diferenças

entre os grupos sejam observadas uma vez que a amostra de partida é sujeita à mesma técnica de preparação.

1.1. Determinação das proteínas totais

Nas preparações de membranas obtidas foram determinadas as proteínas totais pelo método de Bradford [27]. A curva de calibração foi efectuada com um padrão de albumina bovina (BSA) como detalhado no anexo IV. O Gráfico A1 em anexo mostra a curva de calibração obtida. Os resultados obtidos para cada uma das preparações de membranas podem ser consultados na Tabela A 2 em anexo, bem como o rendimento obtido para cada preparação, cuja média foi de $2,54 \pm 1,05$ %.

2. TAMANHO DAS VESÍCULAS

O diâmetro inicial de equilíbrio das vesículas de cada uma das preparações equilibradas num tampão 120 mosM (Manitol 100 mM, Hepes 10 mM, pH 7,4 com KOH) foi medido ($n = 10$) numa aparelho de QELS. Todas as preparações de vesículas mostraram ser homogêneas, originando gráficos unimodais. O tamanho médio de cada uma das preparações de vesículas testadas pode ser consultado na Tabela A 3 em anexo.

No Gráfico III-1 mostram-se todas as medições de diâmetro efectuadas para todas as preparações obtidas:

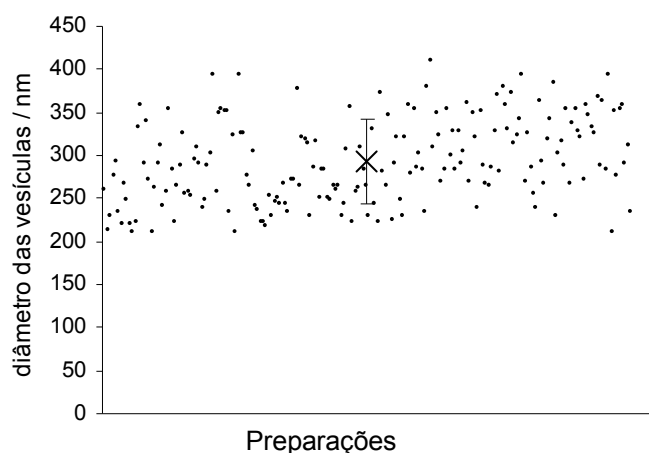


Gráfico III-1 – Diâmetro das vesículas medido por QELS

Este gráfico mostra as várias medições do diâmetro das vesículas (nm) para cada uma das preparações. A média de todas as medições encontra-se assinalada (circulo a cheio) com o respectivo desvio padrão e corresponde ao valor de 293 ± 48 nm.

Verifica-se uma distribuição de tamanhos uniforme para todas as preparações com uma dispersão idêntica. Desta forma pode-se considerar o mesmo diâmetro médio para todas as preparações de vesículas, isto é, 293 ± 48 nm.

3. ESTUDO DA PERMEABILIDADE MEMBRANAR

3.1. Permeabilidade à água e ao glicerol

Cada uma das preparações equilibradas no tampão (Manitol 100 mM, Hepes 10 mM, pH 7,4 com KOH) com osmolaridade 120 mosM foi sujeita a um choque hiperosmótico de tonicidade 2 tal como descrito em Materiais e Métodos (ponto 6.1) para o estudo da permeabilidade membranar à água. Os traçados resultantes do efluxo de água foram recolhidos numa gama de temperatura de 14°C a 37°C e foram ajustados a uma exponencial simples, como se apresenta no gráfico Gráfico III-2. A constante de tempo de cada ajuste foi utilizada na Equação II-9 para se obter o valor de P_f para cada preparação de membranas testada.

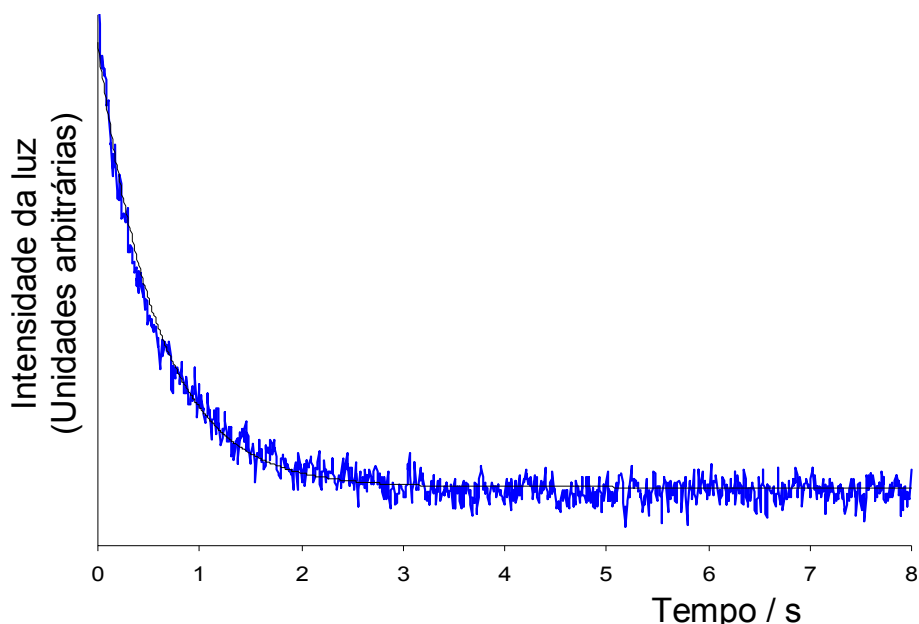


Gráfico III-2 – Sinal de fluxo interrompido devido a um choque osmótico de tonicidade 2 e do correspondente ajuste a uma exponencial simples ($T=23^{\circ}\text{C}$)

Para o estudo da permeabilidade membranar ao glicerol, as preparações equilibradas no tampão (Manitol 100 mM, Hepes 10 mM, pH 7,4 com KOH) com osmolaridade 120 mosM foram sujeitas a um choque hiperosmótico com um

gradiente de 180 mosM de glicerol. Os traçados resultantes do influxo de glicerol foram recolhidos numa gama de temperatura de 14°C a 37°C e foram ajustados a uma exponencial simples, como se apresenta no Gráfico III-3. A constante de tempo de cada ajuste foi utilizada na Equação II-15 para se obter o valor de P_{gly} para cada preparação de membranas testada.

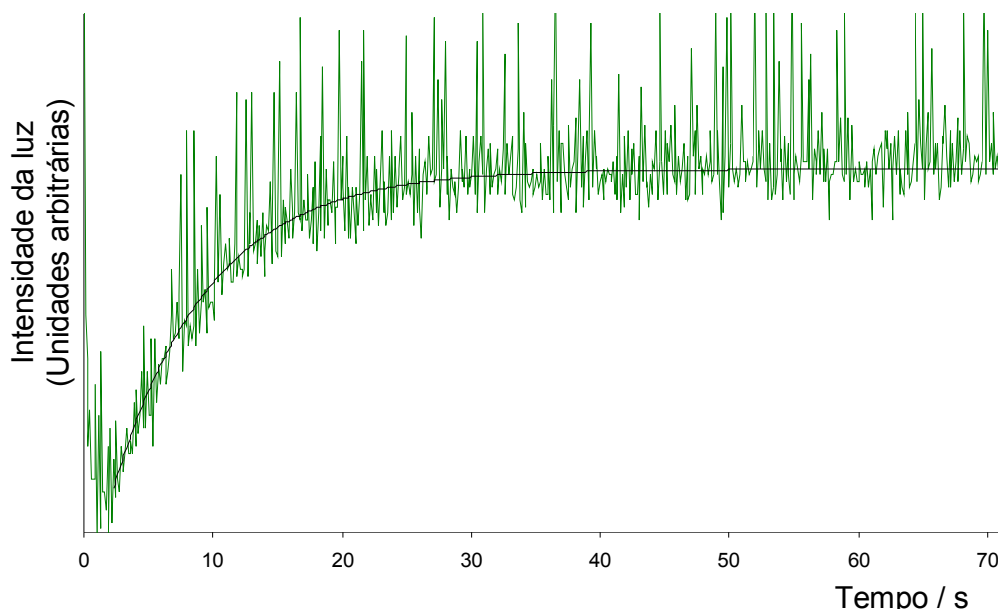


Gráfico III-3 – Sinal de fluxo interrompido devido a um choque de glicerol com gradiente 60 mosM e do correspondente ajuste a uma exponencial simples ($T=23^{\circ}\text{C}$)

As energias de activação foram calculadas utilizando um gráfico de Arrhenius ($\ln k$ vs $1/T$), como descrito (materiais e métodos, ponto 8) e exemplificado no Gráfico III-4.

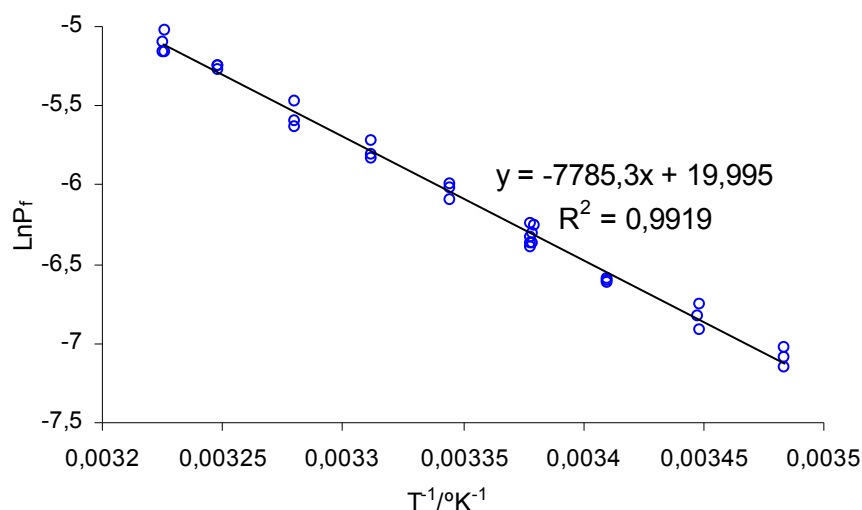


Gráfico III-4 – Representação gráfica de Arrhenius para um dos ensaios de permeabilidade à água e respectiva equação

A Tabela III-1 mostra o resumo dos resultados obtidos (média \pm desvio padrão) para as diferentes permeabilidades (água e glicerol) assim como as respectivas energias de activação dos transportes e os resultados do tratamento estatístico de comparação dos valores de permeabilidade para os vários grupos experimentais. Este, foi feito usando uma análise factorial ANOVA com dois factores, CLA e Gordura (gordura base da dieta), cada um com dois níveis (com e sem CLA; óleo de palma e gordura de ovinos), foi ainda contemplado o factor interacção (CLA x Gordura). Consideram-se resultados significativamente diferentes quando $p < 0,05$. Na Tabela A 3 e no Gráfico A2 do ANEXO V podem ser consultados respectivamente os resultados individuais obtidos para cada elemento de cada grupo alimentar e as médias dos valores dos coeficientes de permeabilidade e energias de activação para o transporte de água e glicerol resumidos na tabela seguinte.

Tabela III-1– Resumo dos resultados obtidos para P_f , P_{gly} , $Ea_{(água)}$ e $Ea_{(glicerol)}$

	Significância (valores de p)							
	P	PCLA	O	OCLA	CLA	Gordura	CLA x Gordura	
$(P_f \pm SD) \times 10^{-3} / \text{cm s}^{-1}$	1,78 \pm 0,20	1,57 \pm 0,15	1,88 \pm 0,04	1,87 \pm 0,09	0,067	0,003	¥	0,096
$(P_{gly} \pm SD) \times 10^{-7} / \text{cm s}^{-1}$	4,53 \pm 0,61	4,11 \pm 0,53	4,71 \pm 0,30	4,69 \pm 0,54	0,287	0,072		0,324
$(Ea_{água} \pm SD) / \text{Kcal mol}^{-1}$	15,09 \pm 0,68	14,82 \pm 0,56	14,68 \pm 0,52	15,07 \pm 0,57	0,843	0,803		0,302
$(Ea_{gly} \pm SD) / \text{Kcal mol}^{-1}$	24,56 \pm 0,87	24,54 \pm 1,88	24,86 \pm 0,85	24,38 \pm 0,88	0,623	0,898		0,648

DIETAS: P = óleo de palma; PCLA = óleo de palma + 1 % de CLA; O = gordura de ovino; OCLA = gordura de ovino + 1 % of CLA; ¥ Tem significância estatística

Os valores encontrados para a energia de activação para o transporte de água ($Ea_{água}$) (superiores a 14 kcal mol⁻¹) são considerados elevados [35] indicando a ausência de canais funcionais. Nesta situação, a via dominante no transporte de água é a camada bilipídica.

Os valores encontrados para a energia de activação para o transporte de glicerol (Ea_{gly}) também são elevados (superiores a 20 kcal mol⁻¹) [37] e da mesma forma indicam que este não se está a efectuar por canais mas sim através da camada bilipídica.

Relativamente à presença de CLA na alimentação, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nos valores de permeabilidade membrana para a água e para o glicerol, nem nos valores para as energias de activação

correspondentes a estes transportes. Pode-se pois concluir que a adição deste suplemento na dieta não altera as propriedades de transporte da membrana celular dos adipócitos quer para a água quer para o glicerol.

Quando se cruzaram os dados relativamente ao tipo de gordura base presente na alimentação, óleo de palma ou gordura de ovino, verificou-se que os valores de P_f apresentam uma diferença que apesar de pequena é estatisticamente significativa. P_f é em média 12% mais elevado para os grupos que ingeriram gordura de ovino ($1,88 \pm 0,04$ e $1,87 \pm 0,09$) comparativamente com os que ingeriram óleo de palma ($1,78 \pm 0,20$ e $1,57 \pm 0,15$) como gordura base. Uma composição diferente nos ácidos gordos dos fosfolípidos que compõem a membrana pode ser a explicação para este facto, uma vez que os ácidos gordos alimentares são incorporados nos fosfolípidos das membranas celulares podendo alterar a sua fluidez e permeabilidade. No entanto, o aumento de 8,8% em média nos valores de P_{gly} para os dois tipos de dieta ($4,53 \pm 0,61$ e $4,11 \pm 0,53$ para os grupos que ingeriram óleo de palma e $4,71 \pm 0,30$ e $4,69 \pm 0,54$ para os grupos que ingeriram gordura de ovino) não foi suficiente para ter significado estatístico considerando-se que permaneceu inalterado nos dois tipos de dieta. Também não se detectaram diferenças nos valores das energias de activação tanto para a água como para o glicerol. Uma alteração dos valores de energia de activação, apenas é indicativa de alteração da via principal de permeação pela membrana (bicamada ou canais). Uma variação da composição lipídica da membrana poderá não ser detectada pela variação da E_a , uma vez que não houve alteração da via de permeação.

3.2. Efeito do $HgCl_2$ nas permeabilidades

A fim de confirmar a não contribuição de aquaporinas funcionais para o transporte de água e glicerol, como revelam os elevados valores de energias de activação para os respectivos transportes, procedeu-se á incubação das preparações membranares com $HgCl_2$, um conhecido inibidor da maior parte das aquaporinas. Após incubação das preparações de membrana com 0.5 mM de $HgCl_2$ durante 5 minutos, as vesículas foram submetidas a choques hiper-osmóticos com soluções de soluto impermeante (efluxo de água) ou com solução hiperosmótica de glicerol (influxo de glicerol) no aparelho de fluxo interrompido.

A partir dos traçados obtidos calcularam-se os valores de P_f e de P_{gly} na presença e na ausência de inibidor. Verificou-se que não havia alteração tanto no caso da permeação do glicerol como da permeação da água. O Gráfico III-5

apresenta os resultados obtidos em cada uma das medições com a respectiva média e desvio padrão apresentados na Tabela III-2. Para o cálculo dos coeficientes de permeabilidade, mediu-se o diâmetro das vesículas incubadas com e sem inibidor verificando-se que não existem diferenças no tamanho.

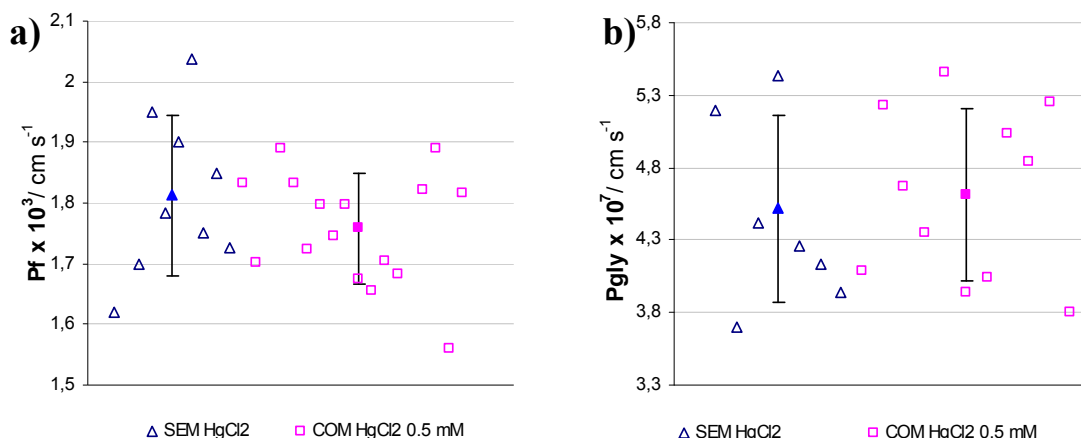


Gráfico III-5 – Permeabilidade (P_f e P_{gly}) na Presença de HgCl₂

A vazios mostram-se os valores de P_f e P_{gly} encontrados nos vários ensaios e a cheio as médias obtidas para cada caso bem como os respectivos desvios padrão para a) a permeação à água e b) permeação pelo glicerol para uma preparação de vesículas com (rosa) e sem HgCl₂ (azul)

Tabela III-2– Resumo dos resultados obtidos para P_f e P_{gly} com e sem inibição pelo HgCl₂

	sem HgCl ₂	com HgCl ₂
$(P_f \pm \text{SD}) \times 10^{-3} / \text{cm s}^{-1}$	1,81±0,13	1,76±0,09
$(P_{gly} \pm \text{SD}) \times 10^{-7} / \text{cm s}^{-1}$	4,52±0,64	4,61±0,59

Sendo os coeficientes de permeabilidade iguais com e sem HgCl₂ tanto no caso da permeação pelo glicerol como no caso da permeação pela água, conclui-se que na preparação obtida não existem canais funcionais para o transporte destas duas moléculas.

De facto, não há resultados na literatura que refiram a expressão da AQP1 em membranas de adipócitos. Quanto à AQP7, apesar de ter sido identificada em tecido adiposo, a sua contribuição para o transporte de água é negligenciável, o que apoia os baixos valores de P_f obtidos. No entanto, esperar-se-ia observar a sua contribuição para o transporte de glicerol. Os baixos valores de P_{gly} , as elevadas energias de activação e a não inibição pelo HgCl₂, levam-nos a concluir que a aquagliceroporina não está presente nas membranas do tecido adiposo utilizado ou, se presente, não está funcional.

As condições experimentais durante a preparação de vesículas de membrana poderão ter levado à eliminação ou inactivação do canal de glicerol. Este aspecto, assim como o facto de ser possível existirem diferenças entre espécies para a expressão de isoformas de aquaporinas, poderão ser futuramente explorados. Na realidade, apesar ter sido identificada a expressão da AQP7 em tecido adiposo de ratos wistar, não há resultados na literatura sobre a mesma especificamente em ratos Zucker. Serão necessários estudos de avaliação do grau de expressão e incorporação na membrana da AQP7 nesta espécie (por Wester blot com anticorpos específicos) para se poder concluir sobre a não contribuição da AQP7 para a os valores de permeação ao glicerol que se obtiveram.

4. CONSTITUIÇÃO EM ÁCIDOS GORDOS DAS DIETAS E SUA INCORPORAÇÃO NAS MEMBRANAS

4.1. Composição e perfil de ácidos gordos das dietas

O perfil em ácidos gordos de cada dieta foi determinado por cromatografia gasosa como descrito na secção 9 dos materiais e métodos. Na Tabela III-3 apresenta-se um resumo dos resultados obtidos organizados segundo número de carbonos e insaturações dos ácidos gordos.

Tabela III-3– Perfil de ácidos gordos nas dietas

	P	PCLA	O	OCLA
<i>Composição de ácidos gordos (% total de FAME)</i>				
14:0	0.92	1.00	1.35	1.34
16:0	35.4	37.5	12.6	12.3
18:0	4.23	4.08	21.0	21.5
18:1c9	34.9	32.3	22.3	21.0
18:1t11	0.06	0.06	9.22	9.42
18:2n-6	20.0	16.0	15.7	12.2
CLA-c9t11	0.02	2.48	1.32	3.51
CLA-t10c12	0.01	2.47	n.d.	2.10
18:3n-3	0.14	0.11	1.23	1.24
Outros	4.38	4.00	15.3	15.4

DIETAS: P = óleo de palma; PCLA = óleo de palma + 1 % de CLA; O = gordura de ovino; OCLA = gordura de ovino + 1 % of CLA; n.d. = não detectado; FAME, (fatty acid methyl esters) esteres metílicos de ácidos gordos.

Como seria de esperar, a quantidade de ambos os isómeros de CLA presentes no grupo P é muito baixa, pois a gordura base deste grupo não os contém. No grupo PCLA foram detectadas quantidades semelhantes de cada isómero de CLA comprovando a sua introdução na dieta na mesma proporção. No grupo O que recebeu como gordura base gordura de ovino, o isómero CLA-t10c12 não foi detectado estando presente apenas o isómero CLA-c9t11 naturalmente presente na gordura destes animais [3] [4]. No grupo OCLA suplementado com quantidades iguais dos dois isómeros, verifica-se que o isómero presente naturalmente na gordura base (CLA-c9-t11) foi detectado em quantidade superior com uma diferença em relação ao outro isómero de 1,41%, que é aproximadamente a quantidade em que foi suplementado (1,32%).

De uma maneira geral o número de moléculas com insaturações é superior no caso da gordura de ovino. Note-se em particular que a quantidade de ácidos gordos com 3 insaturações é 9,9 vezes superior nos grupos que ingeriram gordura de ovino.

4.2. Composição e perfil de ácidos gordos nas preparações de vesículas

O conteúdo em colesterol bem como em ácidos gordos de cada uma das preparações de vesículas de adipócitos foi determinado por cromatografia em fase gasosa tal como descrito na secção 9 dos materiais e métodos. A Tabela III-4 resume os resultados obtidos e os respectivos níveis de significância quando comparados.

Verifica-se que existem diferenças na quantidade dos dois isómeros de CLA presentes nas membranas quando introduzidos na dieta. No grupo P que ingeriu óleo de palma, como era de esperar, não foi detectado CLA uma vez que não estava presente na dieta, mas sim no grupo PCLA. No grupo O que ingeriu gordura de ovino, apenas se detectou o isómero c9t11, uma vez que existe naturalmente na gordura destes animais [3] [4], sendo a quantidade de ambos os isómeros detectada no grupo OCLA significativamente maior do que no grupo O.

Por outro lado, verifica-se que para o isómero c9t11 os valores encontrados nos grupos O e OCLA são significativamente maiores que os encontrados para os grupos P e PCLA. Esta observação confirma o exposto no parágrafo anterior relativamente ao facto de a gordura de ovino já conter por si só CLA.

Estas observações confirmam a incorporação de CLA em maior quantidade nas membranas provenientes dos animais cuja dieta foi suplementada. No entanto

esta diferença de composição não foi suficiente para originar diferenças na permeabilidade da membrana à água e ao glicerol, tal como já foi referido anteriormente.

Quando se comparam as gorduras base nas dietas, verifica-se que o isómero c9t11 está presente em maior quantidade nos animais que receberam gordura de ovino. Este facto por si poderia explicar a diferença no coeficiente de permeabilidade à água, mas nesse caso esperar-se-ia também encontrar diferenças na permeabilidade entre um grupo não suplementado e um grupo suplementado com CLA. Tal não aconteceu.

Por outro lado, as preparações obtidas a partir dos grupos que ingeriram gordura de ovino (O e OCLA) têm menos colesterol e mais PUFAS 18:3n-3, 20:5n-3, 22:5n-3 e 22:6n-3 (de notar que todos são ómega 3, um grupo de ácidos gordos essencial, que tem sido relacionado com diversos benefícios para a saúde). Esta observação apoia o facto de se ter obtido um valor de P_f maior no caso dos grupos que ingeriram gordura de ovino, pois à medida que o número de insaturações presentes nos lípidos da membrana aumenta, aumenta também a sua fluidez. Esta situação encontra-se bem documentada na literatura, em que se demonstrou um aumento da fluidez e permeabilidade membranar com o aumento do grau de insaturação. Um exemplo é o DHA que tem 6 insaturações, tendo sido demonstrado para além de um aumento da fluidez e permeabilidade também a formação de domínios de membrana que excluem o colesterol nas zonas onde se encontra [45] [46].

Tabela III-4– Conteúdo em colesterol (mg/g vesículas) e ácidos gordos (% total de FAME) das membranas

	P	PCLA	O	OCLA	Nível de significância		
					CLA	Gordura	CLA x Gordura
<i>Conteúdo em Colesterol</i>	0.22	0.20	0.14	0.18	ns	*	ns
<i>Composição em ácidos gordos</i>							
14:0	0.87 ^b	1.05 ^a	1.02 ^a	1.07 ^a	**	*	*
15:0	0.11	0.14	0.24	0.25	ns	***	ns
16:0	23.58	24.09	18.67	18.79	ns	***	ns
16:1	0.56	0.66	0.69	0.70	ns	**	ns
16:1c9	4.39	4.81	4.05	3.81	ns	**	ns
17:0	0.30	0.36	0.64	0.66	ns	***	ns
18:0	10.86 ^b	10.06 ^b	13.37 ^a	14.88 ^a	ns	***	*
18:1	3.46	3.94	5.42	5.84	***	***	ns
18:1c9	28.53	26.36	24.15	22.90	ns	**	ns
18:2n-6	11.38	11.90	12.23	12.06	ns	*	ns
CLA-c9t11	0.27	1.15	1.59	2.35	***	***	ns
CLA-t10c12	n.d.	0.37	n.d.	0.44	***	ns	ns
Σ CLA tt	n.d.	0.18	0.05	0.23	***	**	ns
18:3 n-3	0.11	0.11	0.34	0.29	ns	***	ns
20:0	0.29	0.30	0.41	0.38	ns	*	ns
20:1n-9	0.23	0.19	0.15	0.11	***	***	ns
20:3n-6	0.54	0.51	0.60	0.50	ns	ns	ns
20:4n-6	6.84	7.12	7.71	7.09	ns	ns	ns
20:5n-3	0.00	0.06	0.14	0.16	**	***	ns
21:0	0.67	0.73	0.95	0.92	ns	ns	ns
23:0	0.34	0.14	0.19	0.16	*	ns	ns
22:4n-6	0.93	0.85	0.81	0.62	ns	ns	ns
22:5n-3	0.10 ^c	0.11 ^{bc}	0.36 ^a	0.21 ^b	*	***	**
22:6n-3	0.12	0.07	0.21	0.18	ns	***	ns
Σ não identificados	5.51	4.74	5.99	5.42	ns	ns	ns
Σ SFA	37.03	36.88	35.49	37.10	ns	ns	ns
Σ MUFA	37.17	35.96	34.46	33.36	ns	*	ns
Σ PUFA	20.01	20.73	22.41	21.11	ns	ns	ns
Σ CLAs	0.27	1.70	1.64	3.01	***	***	ns
Σ n-3	0.33	0.35	1.05	0.85	ns	***	ns
Σ n-6	19.68	20.38	21.36	20.26	ns	ns	ns

Dietas: P = óleo de palma; PCLA = óleo de palma + 1 % of CLA; O = gordura de ovino; OCLA = gordura de ovino + 1 % of CLA; n.d. = não detectado; FAME, (fatty acid methyl esters) ésteres metílicos de ácidos gordos. Σ SFA, ácidos gordos saturados = somatório de 14:0, 15:0, 16:0, 17:0, 18:0, 20:0, 21:0 e 23:0; Σ MUFA, ácidos gordos monoinsaturados = somatório de 16:1, 16:1c9, 18:1, 18:1c9 e 20:1n-9; Σ PUFA, ácidos gordos polinsaturados = somatório de 18:2n-6, 18:3n-3, 20:3n-6, 20:4n-6, 20:5n-3, 22:4n-6, 22:5n-3 e 22:6n-3; Σ CLA = somatório de CLA-c9,t11, CLA-t10,c12 e CLA tt; Σ n-3 = somatório de 18:3n-3, 20:5n-3, 22:5n-3 e 22:6n-3; Σ n-6 = somatório de 18:2n-6, 20:3n-6, 20:4n-6 e 22:4n-6.

Capítulo IV

CONCLUSÕES

Deste estudo conclui-se que a suplementação de CLA na dieta dos ratos Zucker não provocou alterações na permeabilidade membranar à água e ao glicerol.

No entanto verifica-se que a dieta com gordura de ovino como gordura base, tem um efeito na permeabilidade do tecido adiposo à água, aumentando-a, comparativamente com a situação em que foi administrada uma dieta com óleo de palma como gordura base. Este facto pode ser explicado tendo em conta que o óleo de palma é das gorduras mais saturadas e que a gordura de ovino é significativamente mais rica em PUFA ómega 3 (detectados em quantidade significativamente superior nas preparações O e OCLA) que estão descritos como capazes de alterar as propriedades de fluidez e permeabilidade da membrana plasmática bem como de organização de domínios que excluem o colesterol para zonas mais específicas da membrana.

Para confirmar estas observações impõem-se testes adicionais nomeadamente para quantificar a fluidez das membranas obtidas a partir destes dois tipos de dieta.

Capítulo V

BIBLIOGRAFIA

- [1] José A. Mestre Prates e Cristina M. R. Pereira Mateus; “*Componentes com actividade fisiológica dos alimentos de origem animal*”; Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias, 97 (541) 3-12; (2002)
- [2] Susana V. Martins, Paula A. Lopes, Cristina M. Alfaia, Verónica S. Ribeiro, Teresa V. Guerreiro, Carlos M. G. A. Fontes, Matilde F. Castro, Graça Soveral and José A. M. Prates; “*Contents of conjugated linoleic acid isomers in ruminant-derived foods and estimation of their contribution to daily intake in Portugal*”; British Journal of Nutrition, 98, 1206–1213, (2007)
- [3] M. Plourde, S. Jew, S.C. Cunnane, P.J. Jones; “*Conjugated linoleic acids: why the discrepancy between animal and human studies?*”; Nutr Rev. 66 (2008) 415–421, (2008)
- [4] J. Salas-Salvado, F. Marquez-Sandoval, M. Bullo; “*Conjugated linoleic acid intake in humans: a systematic review focusing on its effect on body composition, glucose, and lipid metabolism*”; Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 46 (2006) 479–488.
- [5] A. Bhattacharya, J. Banu, M. Rahman, J. Causey, G. Fernandes; “*Biological effects of conjugated linoleic acids in health and disease*”; J. Nutr. Biochem. 17, 789–10, (2006)
- [6] P. Yaqoob, S. Tricon, C. M. Williams, R. F. Grimble, G. C. Burdge and P. C. Calder; “*Conjugated linoleic acid and human health-related outcomes*”; British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin, 31, 93–99; (2006)
- [7] C.J. Field, P.D. Schley; “*Evidence for potential mechanisms for the effect of conjugated linoleic acid on tumor metabolism and immune function: lessons from n-3 fatty acids*”; Am. J. Clin. Nutr. 79, 1190S–1198S (2004)
- [8] Anthony G. Lee; “*How lipids affect the activities of integral membrane proteins*”; Biochimica et Biophysica Acta 1666, 62-87 (2004)
- [9] G. Soveral, A. P. Martins, S. V. Martins, P. A. Lopes, C. M. Alfaia, J. A. M. Prates, T. F. Moura; “*Effect of dietary conjugated linoleic acid isomers on water and glycerol permeability of kidney membranes*”; Biochem. Biophys. Res. Commun. 383, 108-112 (2009)
- [10] P.A. Lopes, S.V. Martins, M.S. Pinho, C.M. Alfaia, C.M.G.A. Fontes, P.O. Rodrigues, G.S.L. Moraes, M.F. Castro, R. Pinto, J.A.M. Prates; Diet supplementation with the cis-9,trans-11 “*conjugated linoleic acid isomer affects the size of adipocytes in Wistar rats*”; Nutr. Res. 28, 480–486 (2008)
- [11] N. Maeda, T. Funahashi, I. Shimomura; “*Metabolic impact of adipose and hepatic glycerol channels aquaporin 7 and aquaporin 9*”; Nat Clin Pract Endocrinol Metab. 11 (2008) 627-634 (2008)

- [12] K. Kishida, H. Kuriyama, T. Funahashi, I. Shimomura, S. Kihara, N. Ouchi, M. Nishida, H. Nishizawa, M. Matsuda, M. Takahashi, K. Hotta, T. Nakamura, S. Yamashita, Y. Tochino, Y. Matsuzawa; *"Aquaporin Adipose, a Putative Glycerol Channel in Adipocytes"*; J Biol Chem. 275, 20896-902 (2000)
- [13] Jun-Jie Yin, John K. J. Kramer, Martin P. Yurawecz, A. R. Ynard, Magdi M. Mossoba, and Liangli (Lucy) Yu; *"Effects of Conjugated Linoleic Acid (CLA) Isomers on Oxygen Diffusion- Concentration Products in Liposomes and Phospholipid Solutions"*; Journal of Agricultural and Food Chemistry; 54, 7287-7293 (2006)
- [14] T.F. Moura; *"Cristalografia e Função de Canais Membranares"*; Revista da Sociedade Portuguesa de Química, Vol. 92: 27 – 37; (2004)
- [15] Nielsen, Søren, Jørgen Frøkiær, David Marples, Tae-Hwan Kwon, Peter Agre, and Mark A. Knepper; *"Aquaporins in the Kidney: From Molecules to Medicine"*; Physiol Rev 82: 205–244; (2001)
- [16] Peter Agre, David Kozono; *"Aquaporin water channels: molecular mechanisms for human diseases"*; FEBS Letters 555, 72-78, (2003)
- [17] Kazuyoshi Murata, Kaoru Mitsuoka, Teruhisa Hirai, Thomas Walz, Peter Agre, J. Bernard Heymann, Andreas Engel & Yoshinori Fujiyoshi; *"Structural determinants of water permeation through aquaporin-1"*; NATURE, VOL 407, 5 OCTOBER, 599-605; (2000)
- [18] A. S. VERKMAN AND ALOK K. MITRA; *"Structure and function of aquaporin water channels"*; Am. J. Physiol. Renal Physiol. 278: F13–F28, (2000)
- [19] A. S. Verkman; *"More than just water channels: unexpected cellular roles of aquaporins"*; Journal of Cell Science 118, 3225-3232 Published by The Company of Biologists; (2005)
- [20] Robert I. Macey and Teresa F. Moura; *"Basic Principles of Transport"*; HANDBOOK OF PHYSIOLOGY – Section 14: Cell Physiology, 181 - 259 Published for the American Physiological Society by Oxford University Press; (1997)
- [21] A.S. Verkman; *"Water Permeability Measurement in Living Cells and Complex Tissues"*; J. Membrane Biol. 173, 73–87; (2000)
- [22] Daxiong Fu, Andrew Libson, Larry J. W. Miercke, Cindy Weitzman, Peter Nollert, Jolanta Krucinski, Robert M. Stroud; *"Structure of a Glycerol-Conducting Channel and the Basis for its Selectivity"*; SCIENCE VOL290 20 OCTOBER; 481-486; (2000)

- [23] Jochen S. Hub and Bert L. de Groot; *“Mechanisms of selectivity in aquaporins and aquaglyceroporins”*; PNAS; vol.105, no.4; 1198-1203; January 29 (2008)
- [24] Robert M. Stroud, David Savage, Larry J.W. Miercke, John K. Lee, Shahram Khademi, William Harries; *“Selectivity and conductance among the glycerol and water conducting aquaporin family of channels”*; FEBS Letters; 555; 79-84; (2003)
- [25] Samuel W. Cushman; *“Structure-Function Relationships in the Adipose Tissue”*; The Journal of Cell Biology; volume 46; pag 326-341; (1970)
- [26] Robert G. Parton and Kai Simons; *“The multiple faces of caveolae”*; Nature reviews | Molecular Cell Biology; volume 8; March; 185 – 194; (2007)
- [27] Marion M. Bradford; *“A rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Proteins Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding”*; Analytical Biochemistry; 72; 248-254; (1976)
- [28] Christos D. Georgious, Konstantinos Grintzalis, George Zervoudakis, Ioannis Papapostolou; *“ Mechanism of Coomassie Brilliant Blue G-250 binding to proteins: a hydrophobic assay for nanogram quantities of proteins”*; Anal Bioanal chem.; 391; 391-403; (2008)
- [29] <http://www.bionity.com/articles/e/78825/>
- [30] <http://www.currentprotocols.com/protocol/txa03i>
- [31] Ira N. Levine; *“Physical Chemistry”- chapter 12: Multicomponent Phase Equilibrium*; Fifth Edition; Mc Graw Hill; 341-346; (2002)
- [32] *Semi-Micro Osmometer, Type ML Operating Manual* No.5312390000; KNAUER
- [33] Graça Soveral; *“Comportamento osmótico de vesículas da membrana plasmática apical do túbulo proximal do rim de coelho”*; Tese de candidatura ao grau de doutor; Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; (1995)
- [34] *“Zetasizer Nano Series User Manual- Chapter 14: Size Theory”*; MAN0317; Issue 2.1; 14.1-14.6; July (2004)
- [35] A. Finkelstein; *“Water Movement Through Lipid Bilayers, Pores and Plasma Membranes Theory and Reality – Distinguished lecture series of society of general physiologists”*; John Wiley & Sons, Inc., New York 4; (1987)

- [36] M.P.E. van Heeswijk and C.H. van Os; “*Osmotic Water Permeability of Brush Border and Basolateral Membrane Vesicles from Rat Renal Cortex and Small Intestine*”; J. Membrane Biol. 92, 183-193; (1986)
- [37] Bauxue Yang, Dan Zhao, and A.S. Verkman; “*Evidence against Functionally Significant Aquaporin Expression in Mitochondria*”; The Journal of Biological Chemistry; vol.281; nº24; 16202-16206; June (2006)
- [38] Jean-François Hubert, Laurence Duchesne, Christian Delamarche, Amaury Vaysse, Hervé Gueuné and Celine Raguénès-Nicol; “*Pore selectivity analysis of an aquaglyceroporin by stopped-flow spectrophotometry on bacterial cell suspensions*”; Biology of the Cell; volume 97; 675-686; (2005)
- [39] Bauer, K.; Gros, L.; Sauer, W.; “*Thin chromatography- An introduction*”; Merck, Darmstadt, Germany; (1992)
- [40] Theodore W. Kurtz, R. Curtis Morris, and Harrihar A. Pershadsingh; “*The Zucker Fatty Rat as a Genetic Model of Obesity and Hypertension*”; Hypertension; 13; 896-901; (1989)
- [41] Jeffrey M. Friedman & Jeffrey L. Halaas; “*Leptin and the regulation of body weight in mammals*”; NATURE; Vol 395; 22; October ; 763-770; 1998)
- [42] Jerónimo E, Alves SP, Prates JAM, Santos-Silva J, Bessa RGB; “*Effect of dietary replacement of sunflower oil with linseed oil on intra-muscular fatty acids of lamb meat*”; Meat Sci, 83, 499-505; (2009)
- [43] David F. Savage and Robert M. Stroud; “*Structural Basis of Aquaporin Inhibition by Mercury*”; J. Mol. Biol.; 368; 607–617; (2007)
- [44] Douglas S. Lewis, Edward J. Masoro, Byung P. Yu; “*Quantitative changes in adipocyte plasma membrane in response to nutritional manipulations*”; Journal of Lipid Research; volume 22; 1094-1100; (1981)
- [45] Stephen R. Wassall , William Stillwell; “*Polyunsaturated fatty acid-cholesterol interactions: domain formation in membranes*”; Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, Volume 1788, Issue 1, January, Pages 24-32; (2009)
- [46] Stephen R. Wassall , William Stillwell; “*Docosahexaenoic acid: membrane properties of a unique fatty acid*”; Chemistry and Physics of Lipids, Volume 126, Issue 1, November, Pages 1-27; (2003)
- [47] G. Soveral, R. I. Macey. T. F. Moura; “*Water Permeability of Brush Border Membrane Vesicles from Kidney Proximal Tubule*”; J. membrane Biol.; 158; 219-228; (1997)

- [48] Kenichi Ishibashi, Sei Sasaki, Kiyohide Fushimi, Shinishi Uchida, Michio Kuwahara, Hideyuki Saito, Tetsushi Furukawa, Kichiro Nakajima, Yumi Yamaguchi, Takashi Gojobori, Fumiaki Marumo; *"Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in addition to water expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cells"*; Proc Natl Acad Sci U S A.; July 5; 91(14); 6269–6273; (1994)
- [49] Preston GM, Carroll TP, Guggino WB, Agre P; *"Appearance of water channels in Xenopus oocytes expressing red cell CHIP28 protein"*; Science April 17; 256(5055):385-7; (1992)
- [50] Graça Soveral, Ana Madeira, Maria C. Loureiro-Dias, Teresa F. Moura; *"Membrane tension regulates water transport in yeast"*; Biochimica et Biophysica Acta 1778; 2573–2579; (2008)
- [51] G. Soveral, R. I. Macey and T. F. Moura; *"Membrane stress causes inhibition of water channels in brush border membrane vesicles from kidney proximal tubule"*; Biology of the Cell 89, (275–282); (1997)

ANEXOS

ANEXO I - Potencial Químico e Equilíbrio Osmótico

1. ENERGIA DE GIBBS

1.1. Energia livre de Gibbs

Em termodinâmica, a tendência de um sistema passar de um estado inicial a um estado final é calculada através da variação da energia livre de Gibbs entre os dois estados:

$$\Delta G = G_{final} - G_{inicial} \quad \text{Equação A 1}$$

Se $\Delta G < 0$ o processo é espontâneo, se $\Delta G = 0$ o processo está no equilíbrio, se $\Delta G > 0$ o processo não é espontâneo.

No transporte através de uma membrana, lidamos com alterações na composição em sistemas multifásicos (como por exemplo duas soluções separadas por uma membrana). A temperatura e pressão constantes, quando a composição de uma solução se altera pela adição de dn moles de uma substância s a variação na energia livre (dG) é dada por:

$$dG = \frac{dG}{dn_s} dn_s \quad \text{Equação A 2}$$

Ao termo dG/dn_s chama-se potencial químico da substância s .

2. POTÊNCIAL QÍMICO E ELECTROQUÍMICO

2.1. Potencial Químico

O potencial químico de uma substância (μ_s) é definido como sendo a energia livre por mole dessa substância (energia livre parcial molar) e é definido como:

$$\mu_s \equiv \left(\frac{\partial G}{\partial n_s} \right)_{T, P, n_i} \quad \text{Equação A 3}$$

ou seja, é o acréscimo na energia livre quando se acrescenta um mole de s , mantendo a temperatura (T), a pressão (P) e o número de moles de outras substâncias (n_i) constantes.

2.2. Potencial Electroquímico

Quando a substância em estudo é um ião⁷ e a solução está a um determinado potencial eléctrico, há a necessidade de definir o potencial electroquímico do soluto adicionando ao potencial químico um termo que dá conta das forças eléctricas a actuarem no ião. O potencial electroquímico é dado por:

$$\tilde{\mu}_s = \mu_s + z_s F \psi \quad \text{Equação A 4}$$

onde, z_s é a valência da espécie s , F a constante de Faraday e ψ o potencial eléctrico.

Cada substância, num e noutro lado da membrana (sejam cada uns dos lados in e out), tem o seu potencial electroquímico, dependendo das condições em que se encontra. A substância s fluirá espontaneamente dos potenciais electroquímicos mais elevados para os mais baixos, de forma a minimizar a variação da energia livre de Gibbs:

$$\left\{ \begin{array}{l} \tilde{\mu}_{s-out} > \tilde{\mu}_{s-in} \Rightarrow \text{a substância } s \text{ flui espontaneamente da fase out para a fase in.} \\ \tilde{\mu}_{s-out} = \tilde{\mu}_{s-in} \Rightarrow \text{s está em equilíbrio nas duas fases e macroscopicamente não se observam fluxos entre as duas fases.} \\ \tilde{\mu}_{s-out} < \tilde{\mu}_{s-in} \Rightarrow \text{s flui espontaneamente de in para out.} \end{array} \right.$$

2.3. Forma explícita do potencial electroquímico

O transporte fisiológico é, de uma maneira geral, conduzido por gradientes de concentração, pressão e potencial eléctrico. De acordo com isto é conveniente obter uma equação que dê a forma como o potencial electroquímico depende destas variáveis.

⁷ No presente trabalho não lidamos com espécies carregadas no entanto introduzimos este aspecto uma vez que descreve o caso mais geral. Toda a discussão efectuada nas restantes secções do trabalho assume que as espécies não são carregadas.

Pode ser demonstrado [20] que, para soluções diluídas, o potencial electroquímico de uma substância s divide-se nos seguintes termos:

$$\tilde{\mu}_s = \bar{\mu}_s^{oo}(T) + PV_s + RT \ln \bar{n}_s + z_s F \psi \quad \text{Equação A 5}$$

onde, P é a pressão, V_s o volume parcial molar de s , R a constante dos gases perfeitos, T a temperatura, \bar{n}_s a fracção parcial molar de s , e $\bar{\mu}_s^{oo}(T)$ o potencial químico padrão de s à temperatura T . O termo do potencial químico padrão, $\bar{\mu}_s^{oo}(T)$, contabiliza a energia da espécie química s (ex. energia das ligações químicas) à pressão de 1 bar e, evidentemente, depende da temperatura e do solvente; o termo PV_s contabiliza a dependência da pressão, depende da pressão hidrostática e do volume parcial molar; o termo $RT \ln \bar{n}_s$ depende apenas da temperatura e da concentração da espécie s ; e finalmente o termo $z_s F \psi$ depende da carga da espécie em causa e do potencial eléctrico a que a solução se encontra.

Tendo em conta que para soluções diluídas $\bar{n}_s \approx V_w C_s$ e que, $\mu_s^{oo}(T) \equiv \bar{\mu}_s^{oo}(T) + RT \ln V_w$ e que $\mu_s^o(T, P) \equiv \bar{\mu}_s^{oo}(T) + PV_s$ chega-se à expressão:

$$\tilde{\mu}_s = \mu_s^o(T, P) + RT \ln C_s + z_s F \psi \quad \text{Equação A 6}$$

3. POTENCIAL QUÍMICO DA ÁGUA

A água não tem carga ($z=0$), por isso não faz sentido falar de potencial electroquímico mas apenas de potencial químico, assim a Equação A 5 deve ser escrita da seguinte forma:

$$\mu_w = \bar{\mu}_w^{oo}(T) + PV_w + RT \ln \bar{n}_w \quad \text{Equação A 7}$$

onde o símbolo w em vez de s denota que agora a substância s é a água. Tendo em conta que para soluções diluídas $\ln \bar{n}_w \approx -V_w \sum C_i$ e que $\Pi \equiv RT \sum C_i$, onde Π é a pressão osmótica fica-se com:

$$\mu_w = \bar{\mu}_w^{oo}(T) + V_w (P - \Pi) \quad \text{Equação A 8}$$

4. EQUILÍBRIO OSMÓTICO E LEI DE VAN'T HOFF

Para existir equilíbrio osmótico o potencial químico da água em ambos os compartimentos tem de se igualar, ou seja, $\mu_{w-in} = \mu_{w-out}$, substituindo de acordo com a Equação A 8:

$$\bar{\mu}_{w-in}^{oo}(T) + V_w(P_{in} - \Pi_{in}) = \bar{\mu}_{w-out}^{oo}(T) + V_w(P_{out} - \Pi_{out}) \quad \text{Equação A 9}$$

Os termos $\bar{\mu}_{w-in}^{oo}(T)$ e $\bar{\mu}_{w-out}^{oo}(T)$ são iguais porque consideramos que os compartimentos in e out estão à mesma temperatura e recordando que para soluções diluídas $\Pi \equiv RT \sum C_i$ a equação anterior resume-se a:

$$\Delta P = RT \sum (C_{i-in} - C_{i-out}) = \Delta \Pi \quad \text{Equação A 10}$$

Portanto quando estamos em equilíbrio osmótico a pressão osmótica iguala a pressão hidrostática. Este resultado corresponde à lei de van't Hoff.

4.1. Equilíbrio osmótico em células animais

As células animais são incapazes de manter grandes diferenças de pressão hidrostática, de tal forma que $P_{in} \approx P_{out}$. Por outro lado, os componentes iónicos e proteicos estão muitas vezes longe da idealidade havendo a necessidade de introduzir um coeficiente osmótico⁸ (ϕ_i) que dê conta desses desvios:

Assim a Equação A 10 fica:

$$\Delta \Pi = RT \sum (\phi_{i-in} C_{i-in} - \phi_{i-out} C_{i-out}) = 0 \quad \text{Equação A 11}$$

$$\phi_{i-in} C_{i-in} - \phi_{i-out} C_{i-out} = 0 \quad \text{Equação A 12}$$

As células existem sempre em equilíbrio osmótico. Uma variação da concentração de solutos no meio exterior provoca movimentos de água através da

⁸ Para soluções não ideais multiplicamos as concentrações por um coeficiente osmótico (ϕ). Os iões e as proteínas, em particular, têm coeficientes osmóticos que se desviam significativamente da unidade.

NOTA: Tanto os coeficientes de actividade como os coeficientes osmóticos dão conta dos desvios à idealidade, no entanto eles não são iguais:

Coeficientes de actividade – São definidos para dar conta do potencial químico dos solutos.

Coeficientes osmóticos – São aplicados aos solutos para dar conta do potencial químico do solvente.

membrana até ser atingido um novo estado estacionário, em que os fluxos globais são iguais a zero.

5. LEI DE FICK

Quando um soluto se difunde segundo o seu gradiente de concentração o movimento total resulta do movimento aleatório e individual de cada partícula de soluto. Esta difusão é descrita pela lei de Fick que assume que o fluxo (J) (definido como o número de moles de substância que atravessa uma unidade de área por unidade de tempo ($\text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$)) é proporcional à concentração do gradiente:

$$J = -D \frac{dC}{dx} \quad \text{Equação A 13}$$

onde C é a concentração em mol cm^{-3} , x representa a distância (em cm) percorrida ao longo do caminho de difusão a partir de um ponto de referência fixo e D é o coeficiente de difusão que se assume ser uma constante dependente da temperatura.

ANEXO II – Osmometria e Tonicidade

Normalmente as soluções não se comportam de forma ideal mesmo a concentrações muito baixas, e portanto existe a necessidade de ter em conta estes desvios. Desta forma não trabalhamos com concentrações mas sim com osmolaridade sendo necessário medir a osmolaridade das soluções usadas neste estudo.

1. OSMOLARIDADE, OSMOLALIDADE E CONCENTRAÇÃO

A osmole é uma unidade de medida que define o número de moles de um composto químico que contribui para a pressão osmótica de uma solução ou seja o número de moles osmoticamente activos.

A osmolaridade é uma medida das osmoles de soluto por litro de solução (osmoles/ℓ), enquanto a osmolalidade é uma medida das osmoles por quilograma de solução (osmoles/kg). A osmolaridade não é normalmente usada em osmometria porque é dependente da temperatura uma vez que o volume é dependente da temperatura. No entanto se a concentração for muito baixa a osmolaridade e a osmolalidade são consideradas equivalentes.

A equação para a determinação da osmolalidade de uma solução é dada por:

$$Osm = \phi n m$$

Equação A 14

onde: ϕ - Coeficiente osmótico, que dá conta desvio à idealidade⁹ e varia entre zero e um.

n - Número de partículas nas quais a molécula se dissocia (por exemplo: Para um mole de glucose $n=1$ osmol, no entanto para um mole de cloreto de sódio $n=2$ osmoles, pois neste ultimo caso o sal dissocia-se em dois iões e ambos contribuíram para a pressão osmótica)

m - Concentração molar da solução.

As unidades são Osm/kg

⁹ Tanto os coeficientes de actividade como os coeficientes osmóticos dão conta dos desvios à idealidade, no entanto eles não são iguais:

Coeficientes de actividade – São definidos para dar conta do potencial químico dos solutos.

Coeficientes osmóticos – São aplicados aos solutos para dar conta do potencial químico do solvente.

2. O OSMÓMETRO

A osmolalidade pode ser medida usando um osmómetro que mede propriedades coligativas tais como a depressão crioscópica a elevação ebulioscópica ou a pressão de vapor.

Quando um soluto é adicionado a um solvente puro (mantendo a pressão e a temperatura constantes) o potencial químico do solvente diminui. Esta diminuição no potencial químico do solvente altera o ponto de fusão o ponto de ebulição e a pressão de vapor e é responsável pela pressão osmótica. A estas quatro propriedades são chamadas as propriedades coligativas. A determinação de qualquer uma delas permite determinar as outras.

O osmómetro usado neste estudo mede a depressão crioscópica da água causada pelos solutos em solução.

A depressão crioscópica (Figura A 1) é a diminuição no ponto de fusão de uma solução em relação a temperatura de fusão do solvente puro.

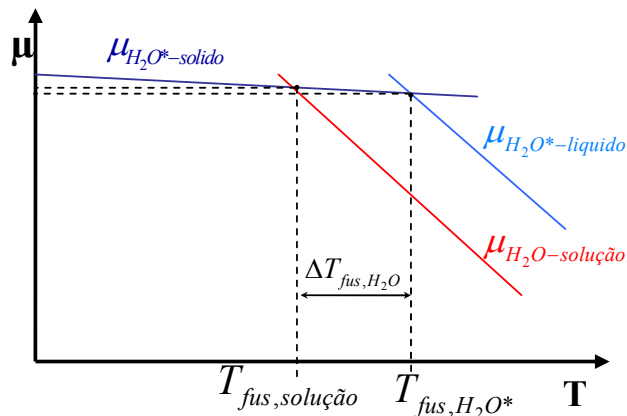


Figura A 1 – Depressão crioscópica (adaptado de [31])

As linhas representam os potenciais químicos da água pura (H_2O^*) sólida, da água pura líquida e da água com solutos em solução como função da temperatura a pressão constante.

Para uma dada temperatura o potencial químico da água na solução é mais baixo que o potencial químico da água pura, por outro lado a água sólida exclui os solutos da rede cristalina, pelo que o potencial químico da água sólida não é afectado pelos solutos em solução.

Quando os potenciais químicos se igualam estamos no equilíbrio líquido-sólido e é a esta intercepção que corresponde a temperatura de fusão.

Pela figura compreende-se facilmente o fenómeno da depressão crioscópica em que a temperatura de fusão de uma solução é inferior à temperatura de fusão do solvente puro.

Esta depressão está relacionada com o número de moles osmoticamente activas em solução, isto é a osmolalidade, pela seguinte expressão:

$$\Delta T_{fus} = K_f \cdot Osm$$

Equação A 15

em que K_f é a constante crioscópica, que para a água tem o valor de 1,858 K.Kg.mol⁻¹, portanto uma solução monomolecular ideal congela aos -1.858 °C. Uma solução com este ponto de fusão tem uma concentração de 1 Osm/kg.

Para medirmos a osmolaridade de uma solução esta é sobre arrefecida abaixo do seu ponto de fusão sem que congele (a água pode ser sobre arrefecida até entre -5°C e -8°C sem que a cristalização ocorra). A um determinado grau de sobre-arrefecimento o congelamento é induzido por vibração da amostra. Nesta altura, a temperatura sobe e autoestabiliza-se no ponto de fusão da solução. O aparelho possui um ponteiro que se move de acordo com a temperatura. Quando o ponteiro estabiliza podemos ler na escala a que osmolaridade corresponde o ponto de fusão da solução em causa. Na Figura A 2 mostra-se uma ilustração das curvas de temperatura versus tempo para a água pura e água com um soluto em solução:

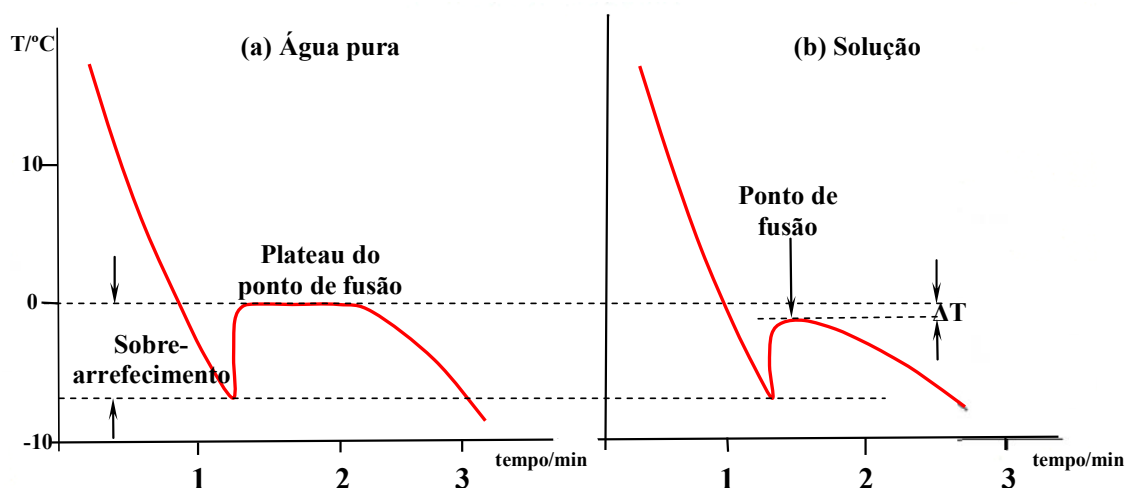


Figura A 2 – Temperatura vs tempo para a água pura e água com um soluto em solução (adaptado de [32])

Inicialmente ambas as amostras são sobre-arrefecidas até uma determinada temperatura, sem que o congelamento ocorra. A solidificação é induzida por vibração da amostra. Nesta altura a temperatura sobe até ao ponto de fusão da amostra.

(a) Água pura: Após o sobre-arrefecimento a temperatura sobe aos 0°C (ponto de fusão da água pura) e permanece lá por algum tempo.

(b) Solução: Após o sobre-arrefecimento a temperatura atinge o seu máximo (ponto de fusão da solução), que é sempre inferior ao da água pura, e rapidamente volta a descer.

3. TONICIDADE

A tonicidade do choque é definida como a razão entre as osmolaridades internas, após ter sido atingido o equilíbrio e no início do choque osmótico:

$$\Lambda \equiv \frac{(Osm_{in})_{\infty}}{(Osm_{in})_0}$$

Equação A 16

onde Λ é a tonicidade, $(Osm_{in})_{\infty}$ a osmolaridade após ter sido atingido o equilíbrio e $(Osm_{in})_0$ a Osmolaridade inicial.

A osmolaridade interna após ter sido atingido o equilíbrio $(Osm_{in})_{\infty}$ será igual à osmolaridade do meio externo (no caso de não existir diferença de pressão hidrostática entre o interior e o exterior da vesícula), além disto como o volume total ocupado pelas vesículas é muito pequeno comparado com o volume do meio externo a estas, podemos considerar que a osmolaridade da solução externa se mantém constante, chamemos-lhe simplesmente Osm_{out} . À osmolaridade interna no tempo zero chamemos simplesmente Osm_{in} , sendo que esta corresponderá à osmolaridade da solução em que as vesículas foram equilibradas.

$$\Lambda = \frac{Osm_{out}}{Osm_{in}}$$

Equação A 17

A tonicidade é uma medida da amplitude do choque osmótico: Quanto maior for a tonicidade, maior a amplitude do choque osmótico e consequentemente maior a variação do volume vesicular.

No caso destes ensaios, a osmolaridade externa (Osm_{out}) será a média das osmolaridades das soluções colocadas nas seringas de injeção de fluxo, uma vez que são injectados para a cuvette volumes iguais das soluções contidas nas seringas (Figura A 3):

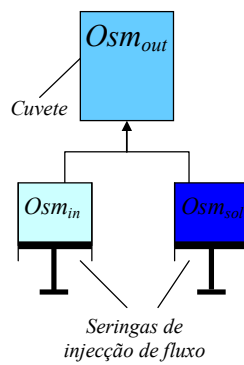


Figura A 3 – Relação entre as osmolaridades das soluções nos vários compartimentos do aparelho de Stop-Flow

$$Osm_{out} = \frac{Osm_{in} + Osm_{sol}}{2}$$

Equação A 18

em que: Osm_{in} é a osmolaridade do meio em que as vesículas estão equilibradas, Osm_{sol} é a osmolaridade da solução colocada na outra seringa e Osm_{out} é a osmolaridade da solução na cuvete onde decorre o choque osmótico.

ANEXO III - Determinação do tamanho das vesículas por dispersão dinâmica da luz (Quasi Elastic Light Scattering QELS)

1. FLUTUAÇÕES NA INTENSIDADE DA LUZ DISPERSA

Se uma partícula pequena for iluminada por um raio de luz ela dispersa-lo-á em todas as direcções.

A Figura A 4 mostra as ondas de luz dispersas (apenas numa direcção) pelas partículas sendo recolhidas por um detector.

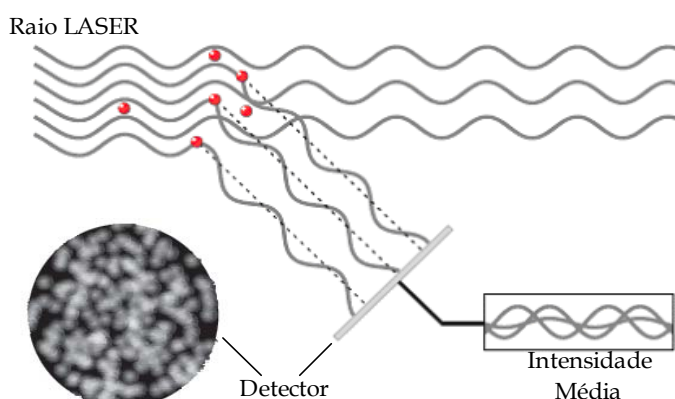


Figura A 4 – Esquema da luz dispersa recolhida pelo detector [34]

Uma suspensão de partículas é iluminada por uma fonte de luz coerente e monocromática (raio LASER).

Os raios que atingem partículas são dispersos em todas as direcções (no entanto, para simplificação, a figura só mostra os que são dispersos na direcção do detector). No detector iremos ter zonas iluminadas, onde as ondas interferem construtivamente e zonas escuras, onde as ondas interferem destrutivamente. O que o aparelho “vê” é esta intensidade média. Como as partículas em questão são pequenas, e portanto estão sujeitas a movimento browniano, as zonas escuras e claras no detector irão flutuar com o tempo. O aparelho mede esta flutuação da intensidade ao longo do tempo e relaciona-a com as dimensões das partículas.

Estas ondas podem interferir construtiva ou destrutivamente. Como as partículas, devido às suas dimensões reduzidas, estão sujeitas a movimento browniano, a intensidade da luz dispersa captada no detector irá variar ao longo do tempo (Figura A 5 (a)).

Um aspecto importante do movimento browniano das partículas é que, quanto mais pequenas elas forem mais rápido será o seu movimento e mais rápidas as flutuações provocadas na intensidade da luz dispersa.

O aparelho segue esta flutuação da intensidade da luz dispersa ao longo do tempo e relaciona-a com o tamanho das partículas.

2. INTERPRETAÇÃO DAS FLUTUAÇÕES NA INTENSIDADE DA LUZ DISPERSA

Dentro do aparelho, existe um instrumento chamado correlator digital. Este dispositivo basicamente mede o grau de semelhança entre dois sinais durante um determinado período de tempo, relacionando-os através de uma função de correlação em função do tempo (Figura A 5 (b)):

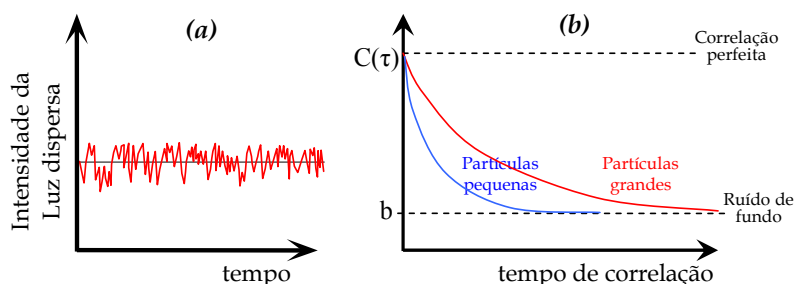


Figura A 5 – Intensidade da luz dispersa e respectiva função de correlação (adaptado de [34])

(a) Na figura representa-se a intensidade da luz dispersa em função do tempo. As flutuações observadas são devidas ao movimento browniano das partículas responsáveis pela dispersão da Luz.

(b) Nesta figura representa-se a função de correlação em função do tempo de correlação.

Se compararmos um sinal com ele mesmo (tempo de correlação igual a zero) obtemos uma correlação perfeita, no entanto à medida que vamos comparando esse sinal com outros sinais obtidos cada vez mais distantes no tempo verificamos que a correlação entre eles decai exponencialmente aproximando-se de uma constante que corresponde a uma correlação mínima entre os sinais que corresponde ao ruído de fundo (correlação zero). Se se estiverem a medir partículas grandes então, como elas se movem mais lentamente, a intensidade flutuará mais lentamente, o que se reflectirá num decaimento da correlação mais lento. De forma semelhante, se se estiverem a medir partículas pequenas a intensidade da luz dispersa flutuará mais rapidamente, o que se reflectirá num decaimento da correlação mais rápido, portanto o decaimento da função de correlação é tanto mais acentuado quanto menor for a partícula.

Para uma suspensão monodispersa de partículas globulares rígidas, a função de correlação é dada por:

$$C(t) = a \cdot e^{\left(\frac{-t}{\tau}\right)} + b \quad \text{Equação A 19}$$

onde $C(t)$ é a Intensidade da autocorrelação medida; t o Tempo; a e b são Constantes e τ é o Tempo de Relaxação.

$$\frac{1}{\tau} = 2 \cdot D_T \cdot Q^2$$

Tendo em conta que:

Equação A 20

onde: D_T é o Coeficiente de difusão translacional e Q o Vector onda de difusão

$$Q = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \cdot \sin\left(\frac{\theta}{2}\right)$$

Em que Q é dado por,

Equação A 21

onde λ_0 é o comprimento de onda do feixe de luz incidente; n o índice de refração do meio e θ o ângulo de dispersão

Então o raio hidrodinâmico da partícula (raio da partícula hidratada) pode ser calculado através da equação de Stokes-Einstein:

$$D_T = \frac{K_B T}{6\pi\eta R_h}$$

Equação A 22

onde K_B é a Constante de Boltzman, T a Temperatura em Kelvin, η a Viscosidade do solvente e R_h o Raio hidrodinâmico

Resumindo o que o aparelho faz é:

- Medir a correlação entre os sinais obtidos ao longo do tempo.
- Assentar as medições à Equação A 19 de forma a obter o tempo de relaxação (τ).
- Calcular o coeficiente de difusão translacional (D_T) na Equação A 20.
- Calcular o raio da partícula (R_h) através da Equação A 22.

1.1. Sistemas Polidispersos

De notar que apesar das equações atrás descritas serem válidas para suspensões de partículas monodispersas, as mesmas não podem ser aplicadas no caso de termos populações com diferentes tamanhos, ou seja em sistemas polidispersos:

Por um lado é necessário considerar que quanto menor o tamanho da partícula menor a intensidade da luz dispersa, esta relação é dada por:

$$I_s = I_0 \cdot N \cdot G^2 \cdot V^2$$

ou

$$I_s = I_0 \cdot N \cdot G^2 \cdot \frac{16}{9} \pi^2 R_h^6$$

Equação A 23

onde I_s é a Intensidade da luz dispersa, I_0 a Intensidade da luz incidente, N o nº de partículas por ml, G um factor dependente da forma da partícula relacionado com a possível interferência interna da partícula, V o volume da partícula e R_h o raio hidrodinâmico da partícula.

Por outro lado, os métodos de análise de amostragens polidispersas com maior resolução requerem um algoritmo matemático adicional para o tratamento da função de correlação. A correlação resultante neste tipo de populações é formada por uma mistura de decaimentos exponenciais, cada um com um tempo de relaxação diferente relacionado com o tamanho da partícula. Cada tamanho diferente contribui de forma distinta com a sua exponencial para o total de luz dispersa.

3. APRESENTAÇÃO DAS DISTRIBUIÇÕES DE TAMANHOS POR NÚMERO, VOLUME E INTENSIDADE

A informação assim recolhida é usada para gerar uma distribuição dos tamanhos das partículas. A Figura A 6 seguinte apresenta um gráfico típico com uma distribuição de tamanhos das partículas:

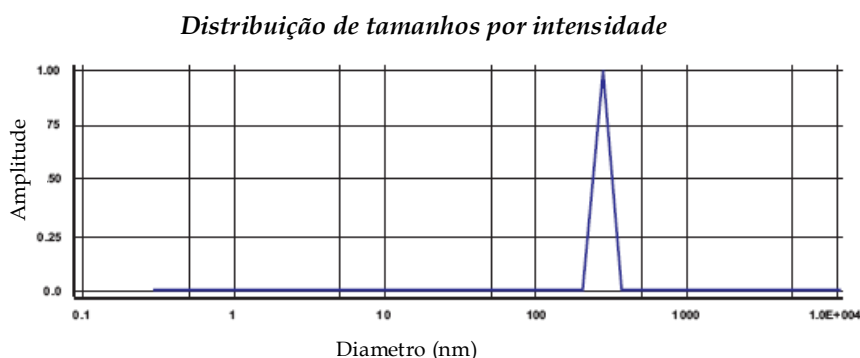


Figura A 6 – Distribuição de tamanhos por intensidade [34]

O gráfico mostra uma distribuição de tamanhos típica. O eixo dos xx mostra a distribuição nas classes de tamanhos enquanto o eixo dos yy mostra intensidade relativa da luz dispersa. Por este motivo esta é conhecida como uma distribuição por intensidade.

Apesar de a distribuição fundamental gerada pelo aparelho ser uma distribuição por intensidades ela pode ser convertida em uma distribuição por volume e esta ser por sua vez convertida numa distribuição por número. No entanto as distribuições por número são de uso limitado pois pequenos erros na recolha dos dados para a função de correlação geram grandes erros na distribuição por número.

A Figura A 7 explica a diferença entre estes três tipos de distribuição:

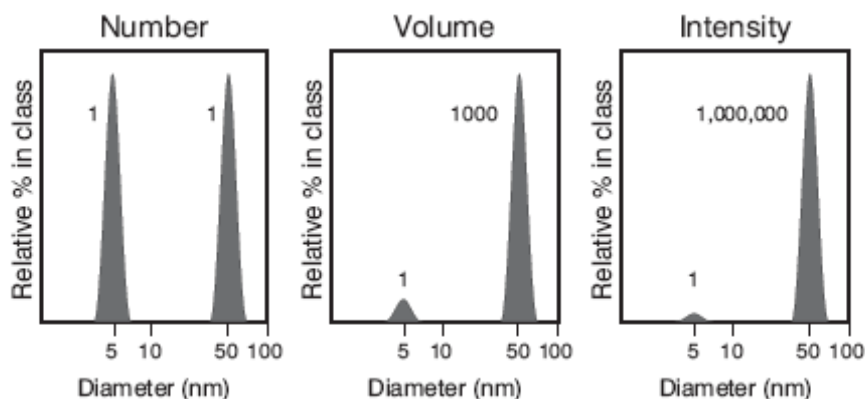


Figura A 7 – Diferença entre distribuições por número, volume e intensidade [34]

Consideremos uma amostra que tenha partículas de apenas dois tamanhos diferentes (5 nm e 50 nm) mas em número igual. O primeiro gráfico mostra os resultados como uma distribuição por número, como esperado ambos os picos têm a mesma altura (1:1) pois as partículas encontram-se presentes em números iguais.

O segundo gráfico mostra os resultados na forma de distribuição por volume. A área do pico correspondente às partículas de 50 nm é 1000 vezes superior à do pico correspondente às partículas de 5 nm. Isto porque o volume ocupado pelas partículas de 50 nm é 1000 vezes superior (volume de uma esfera = $4r^3/3$).

O terceiro gráfico mostra os resultados na forma de distribuição por intensidade. Agora a área do pico correspondente às partículas de 50 nm é 1 000 000 de vezes superior à área do pico das partículas de 5 nm. Isto porque as partículas grandes dispersam muito mais luz que as partículas pequenas (a intensidade da luz dispersa por uma partícula é proporcional à sexta potência do seu diâmetro (Equação A 23)).

Vale a pena repetir que a distribuição básica obtida pelo aparelho é uma distribuição por intensidades, todas as outras são geradas a partir desta e que portanto, pequenos erros na recolha dos dados para a função de correlação geram grandes erros na distribuição por número.

De salientar ainda que o tipo de não uniformidades passível de causar dispersão é demasiado extenso para listar, mas incluem partículas como as vesículas ou poeiras, bolhas de ar, gotas, flutuações na densidade dos fluidos, imperfeições em sólidos cristalinos, rugosidades, etc.

Assim se compreende facilmente que este possa ser um método bastante sujeito a erros, a menos que o cuidado no tratamento e manipulação da amostra e material seja extremo. A amostra não deve estar contaminada com poeiras, a solução em que a amostra é diluída deve ser filtrada e a célula em que a medição é feita deve estar intacta e escrupulosamente isenta de riscos e de poeiras.

4. APARELHO

As determinações do tamanho das vesículas levadas a cabo neste trabalho foram efectuadas num aparelho Brookhaven Instruments BI-90 com um LASER HeNe 638 nm, e a luz dispersa recolhida num ângulo de 90°. A figura seguinte apresenta um esquema de um aparelho semelhante ao usado neste estudo para a medição se tamanhos das vesículas:

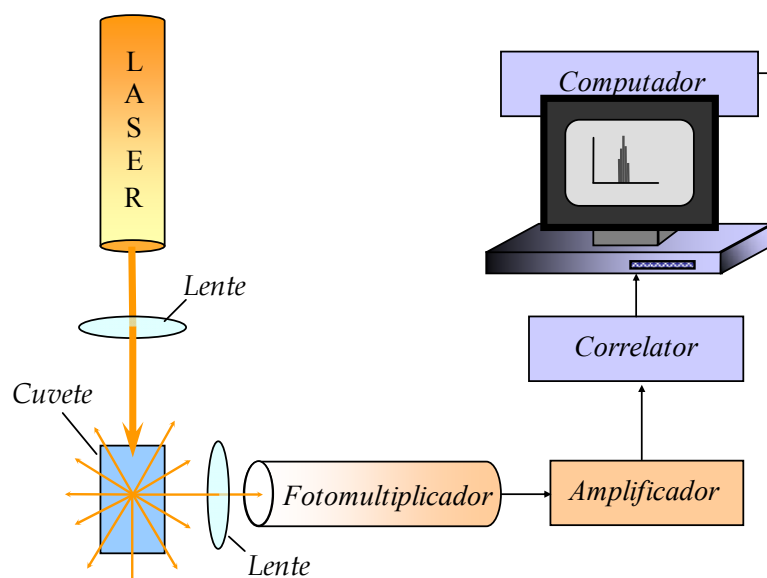


Figura A 8 – Esquema de um aparelho de QELS

Um raio LASER incide na amostra contida na cuvete.

As partículas dispersam a luz em todas as direcções.

O sistema de detecção (lente, tubo fotomultiplicador, amplificador) recolhem a luz dispersa num ângulo de 90°.

O correlator correlaciona os dados adquiridos que posteriormente são apresentados no monitor de um computador.

O raio de luz incidente tem de ser coerente e monocromático como por exemplo um raio laser. Este incide sobre a amostra contida numa cuvete. A amostra dispersa a luz em todas as direcções. O sistema de detecção recolhe a luz dispersa num ângulo de noventa graus (como a luz é dispersa em todas as direcções, em teoria o sistema de detecção pode estar colocado em qualquer ângulo). O Correlator correlaciona os dados devolvendo os resultados para o ecrã de um monitor, onde são apresentados na forma de distribuição dos tamanhos.

ANEXO IV - Determinação de Proteínas Totais

1. MÉTODO DE BRADFORD

1.1. Fundamento

Para a determinação das proteínas totais obtidas em cada preparação de membranas foi usado o método de Bradford [27]. Este método baseia-se na observação de que o máximo de absorvência de uma solução ácida do corante Coomassie Brilliant Blue (CCB) se desvia de 470 nm para 595 nm quando este se liga a proteínas [28] (Figura A 9).

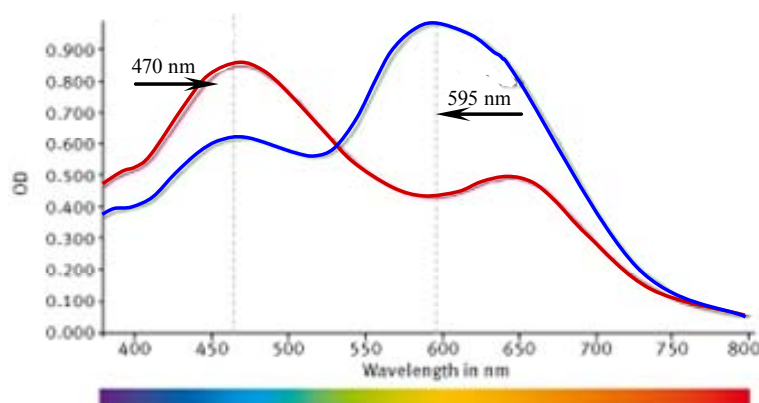


Figura A 9 – Espectro do CBB Ligado (linha vermelha) e não Ligado (linha azul) a Proteínas (adaptado de [29])

Após a ligação o máximo de absorvência desvia-se de 465nm para 595nm

Portanto, a uma absorvência de 595 nm podemos usar a lei de Lambert-Beer para determinar a concentração de proteínas presente numa solução.

O corante existe em três formas: catiónica (vermelha), neutra (verde) e aniônica (azul). Em condições acídicas o corante está protonado e é predominantemente vermelho ($A_{\text{máx}} = 470 \text{ nm}$); contudo quando este se liga a uma proteína, converte-se numa forma desprotonada estável com cor azul ($A_{\text{máx}} = 595 \text{ nm}$). É esta forma que é detectada a 595 nm [28].

O Coomassie Brilliant Blue liga-se essencialmente a resíduos básicos (em especial à Arg e em menor grau à Lys e His) e secundariamente a resíduos aromáticos (Trp, Phe, Tyr) [28] (Figura A 10).

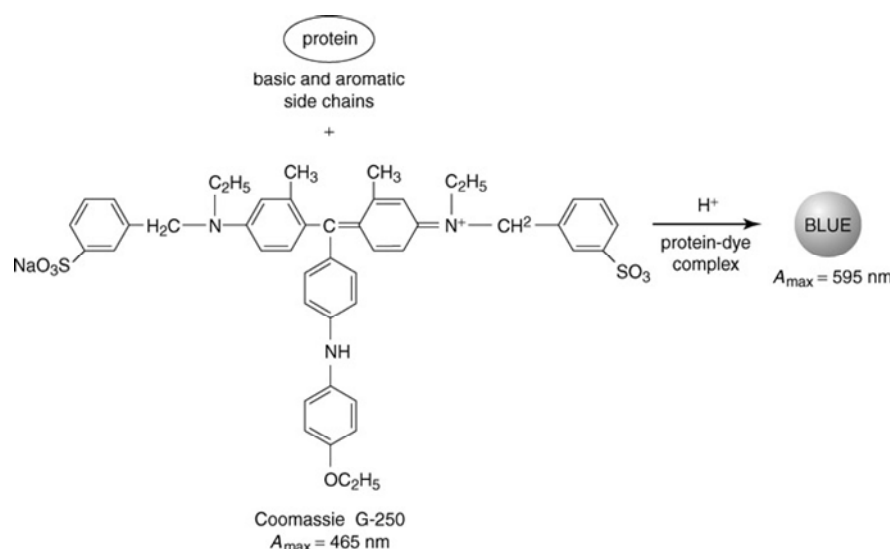


Figura A 10 – Representação Esquemática da Reacção de Ligação do CBB a Proteínas [30]

Após a ligação do corante a proteínas o máximo de absorvância desvia-se de 465nm para 595nm.

1.2. Recta de Calibração para a determinação de proteínas totais

Para elaboração da recta de calibração com albumina, preparou-se uma amostra de albumina com 1 mg/ml e pipetaram-se as quantidades descritas na Tabela A 1 para uma célula de espectrofotómetro. Após 10 minutos à temperatura ambiente, mediu-se a absorvência a 595 nm.

Tabela A 1 – Preparação de Padrões da recta de Calibração com Albumina

	Branco	P1	P2	P3	P4	P5
Albumina (1 mg/ml) / μ l	0	5	10	15	20	25
H ₂ O / μ l	800	795	790	785	780	775
Reagente deBradford / μ l	200	200	200	200	200	200
Absovência 595 nm (n = 3)	0	0,381	0,628	0,821	1,093	1,327
		0,341	0,622	0,853	1,059	1,323

A recta de calibração assim obtida apresenta-se no Gráfico A1

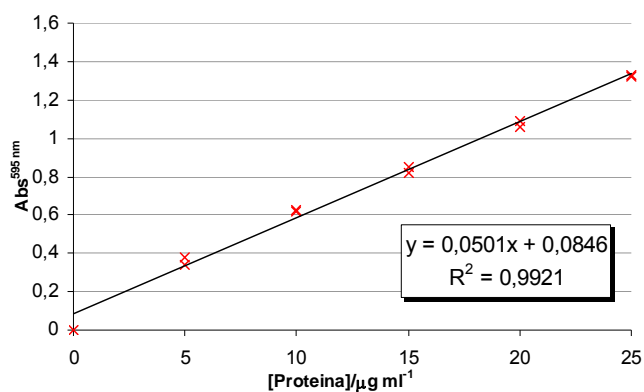


Gráfico A1 – Recta de Calibração para Determinação das Proteína Totais

1.2.1. Cálculos

Para o cálculo da concentração de proteínas totais presentes em cada amostra pipetou-se 10 µl de amostra numa diluição conveniente, 795 µl de água, 200 µl de reagente de Bradford; lê-se a absorvência a 595 nm e usa-se a seguinte equação:

$$[Proteína]_{amostra} / (\mu g / ml) = 100 \times \frac{Abs_{595nm}}{declive} \times diluição$$

Equação A 24

ANEXO V - RESUMO DOS RESULTADOS

A Tabela A 2 apresenta os resultados obtidos para a quantificação das proteínas totais bem como o rendimento obtido.

Tabela A 2 – Resumo dos resultados (Proteínas Totais e Rendimentos)

	Peso do tecido (g)	Homogenato		Vesículas		Rendimento (mg de proteínas nas ves/ mg proteínas no homogenato) x100
		Volume (ml)	[Proteínas] (mg/ml)	Volume (ml)	[Proteínas] (mg/ml)	
Grupo P	8,172	200	0,813	1,020	3,873	2,43%
	8,074	200	0,606	1,030	3,082	2,62%
	7,857	200	0,488	1,680	2,201	3,79%
	7,313	200	0,423	1,560	1,129	2,08%
	8,308	200	0,676	1,000	3,645	2,70%
	5,934	200	0,109	0,608	0,680	1,91%
	8,216	200	0,716	2,553	1,150	2,05%
Grupo PCLA	8,427	200	0,425	1,200	2,070	2,92%
	8,712	200	0,528	1,000	2,656	2,52%
	7,242	200	0,445	1,230	1,346	1,86%
	8,815	200	0,566	1,000	1,987	1,75%
	8,469	200	0,459	1,300	1,549	2,19%
	6,862	200	0,335	1,150	1,126	1,93%
	10,627	200	0,498	0,920	3,565	3,30%
Grupo O	7,493	200	0,519	1,100	1,991	2,11%
	8,875	200	0,438	1,010	2,309	2,66%
	10,544	200	0,695	1,570	2,156	2,43%
	8,363	200	0,521	1,020	2,355	2,31%
	7,376	200	0,208	0,950	1,858	4,25%
	6,365	200	0,437	1,330	1,445	2,20%
Grupo OCLA	8,882	200	0,489	1,175	1,908	2,29%
	8,253	200	0,420	0,900	1,894	2,03%
	7,664	200	0,421	1,010	2,166	2,60%
	7,284	200	0,455	0,950	2,043	2,13%
	7,402	200	0,489	0,900	2,416	2,22%
	7,580	200	0,444	1,000	1,637	1,84%
MÉDIA (SD) 8,043 (1,057)		0,485 (0,146)		1,160 (0,368)	2,086 (0,792)	2,43% (0,59%)

* Calculado tendo em conta todas as medições efectuadas (nos diâmetros apresentados para cada preparação de cada grupo apenas é apresentada a média dos vários resultados obtidos para cada preparação)

A Tabela A 3 apresenta os resultados obtidos para cada uma das preparações dos vários grupos alimentares. Apresentam-se os diâmetros médios das vesículas e os coeficientes de permeabilidade para a água (Pf) e glicerol (Pgly) e as energias de activação dos transportes ($E_{a(\text{água})}$ e $E_{a(\text{glicerol})}$) bem como as médias encontradas para cada grupo e os respectivos desvios padrão (SD).

Tabela A 3 – Resumo dos resultados (Diâmetros e Permeabilidade)

	Diâmetro (média em nm)	Água		Glicerol	
		Ea (Kcal/mol)	Pf x 10 ⁻³ (cm/s)	Ea (Kcal/mol)	Pgly x 10 ⁻⁷ (cm/s)
Grupo P	258 (n=9)	14,124	2,079	25,545	5,219
	386 (n=6)	15,267	1,720	25,544	4,118
	329 (n=10)	15,570	1,849	23,415	5,267
	324 (n=5)	17,067	1,464	24,740	3,874
	255 (n=11)	14,334	1,821	24,167	5,009
	301 (n=10)	----	----	----	4,238
	----	14,157	1,757	23,959	4,001
<i>MÉDIA±SD</i>		<i>15,087±1,144</i>	<i>1,782±0,200</i>	<i>24,562±0,871</i>	<i>4,532±0,607</i>
Grupo PCLA	302 (n=8)	14,850	1,729	26,998	4,410
	236 (n=7)	14,632	1,610	23,900	4,182
	345 (n=5)	15,752	----	23,716	4,078
	261 (n=7)	14,282	1,426	22,001	3,919
	316 (n=10)	14,843	1,364	23,174	4,214
	299 (n=4)	15,267	1,585	26,826	4,849
	292 (n=11)	14,134	1,704	25,188	3,104
<i>MÉDIA±SD</i>		<i>14,823±0,558</i>	<i>1,57±0,15</i>	<i>24,543±1,875</i>	<i>4,108±0,533</i>
Grupo O	303 (n=11)	15,140	1,929	24,949	4,852
	290 (n=10)	14,229	1,850	25,504	4,489
	326 (n=9)			25,100	5,141
	288 (n=8)	14,394	1,909	24,584	4,795
	289 (n=10)	14,298	1,882	23,313	4,694
	305 (n=6)	15,357	1,823	25,689	4,291
<i>MÉDIA±SD</i>		<i>14,684±0,525</i>	<i>1,879±0,043</i>	<i>24,857±0,853</i>	<i>4,710±0,296</i>
Grupo OCLA	303 (n=7)	15,334	1,965	25,002	5,205
	240 (n=8)	14,756	1,818	24,833	4,582
	254 (n=5)	14,525	1,828	22,963	4,912
	255 (n=6)	14,519	1,894	23,778	3,710
	268 (n=10)	15,954	1,968	25,351	4,656
	307 (n=11)	15,334	1,732	24,336	5,097
<i>MÉDIA±SD</i>		<i>15,070±0,569</i>	<i>1,868±0,092</i>	<i>24,377±0,884</i>	<i>4,694±(0,539</i>
<i>MÉDIA± SD</i>		<i>293 ± 48*</i>			

* Desvio padrão calculado tendo em conta todas as medições efectuadas (os diâmetros apresentados na tabela para cada preparação de cada grupo apenas são a média dos vários resultados obtidos para cada preparação).

No Gráfico A2 apresenta-se os valores dos coeficientes de permeabilidade e energias de activação médios para o transporte de água e glicerol bem como os respectivos desvios padrão para os vários grupos apresentados na tabela anterior:

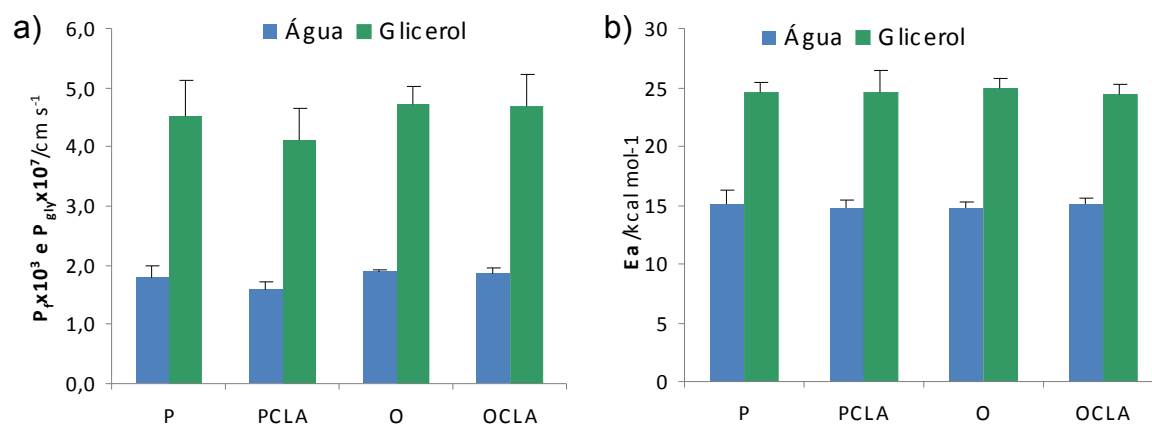


Gráfico A2– Resumo dos resultados obtidos para P_f , P_{gly} , $Ea_{(água)}$ e $Ea_{(glicerol)}$